

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



550505

(43) 国際公開日  
2004年10月7日 (07.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/084934 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 38/27, 48/00, 31/711, 9/127, 9/50, 35/76, A61P 11/06

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004133

(22) 国際出願日: 2004年3月24日 (24.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-86268 2003年3月26日 (26.03.2003) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): クリングルファーマ株式会社 (KRINGLE PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒542-0081 大阪府大阪市中央区南船場2丁目10-27 KAZU ITビル605号室 Osaka (JP).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): クリングルファーマ株式会社 (KRINGLE PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒542-0081 大阪府大阪市中央区南船場2丁目10-27 KAZU ITビル605号室 Osaka (JP).

(72) 出願人および  
(72) 発明者: 中村 敏一 (NAKAMURA,Toshikazu) [JP/JP]; 〒606-8333 京都府京都市左京区岡崎法勝寺町1-4 Kyoto (JP).

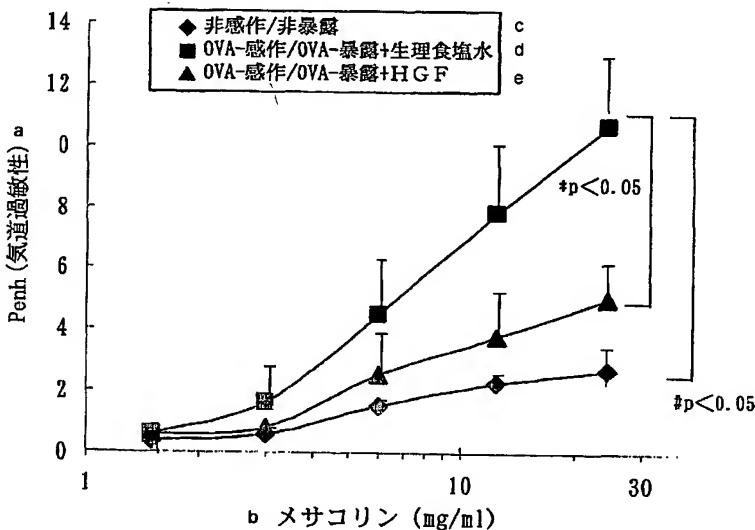
(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 金廣 有彦 (KANEHIRO,Arihiko) [JP/JP]; 〒700-0817 岡山県岡山市弓之町15-28-402 Okayama (JP). 谷本 光音 (TANIMOTO,Mitsune) [JP/JP]; 〒703-8217 岡山県岡山市土田383-1 Okayama (JP). 伊藤亘 (ITO,Wataru) [JP/JP]; 〒700-0011 岡山県岡山市学南町3丁目13-18 Okayama (JP). 松本 邦夫 (MATSUMOTO,Kunio) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府箕面市小野原東6丁目25-2-204 Osaka (JP).

(74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI,Ryo); 〒530-0003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番27号 桜橋千代田ビル5階 Osaka (JP).

(続葉有)

(54) Title: ASTHMA PREPARATION

(54) 発明の名称: 哮息治療剤



a...Penh (BRONCHIAL HYPERSENSITIVITY)  
b...METHACHOLINE (mg/ml)  
c...NON-SENSITIZED/NON-EXPOSED  
d...OVA-SENSITIZED/OVA-EXPOSED + PHYSIOLOGICAL SALINE  
e...OVA-SENSITIZED/OVA-EXPOSED + HGF

(57) Abstract: A preventive or therapeutic agent for asthma, comprising HGF or its salt as an active ingredient.

(57) 要約:

HGF又はその塩を有効成分として含有する喘息の予防又は治療剤。

WO 2004/084934 A1



(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- *USのみのための発明者である旨の申立て* (規則4.17(iv))

添付公開書類:

- *国際調査報告書*

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 喘息治療剤

## 5 技術分野

本発明は喘息治療剤に関する。更に詳細には、気管支喘息における炎症反応を極めて有効に抑制し、しかも副作用のない安全な喘息の予防又は治療剤に関する。

## 10 背景技術

現在社会においては、自動車や工場等からの排気ガス、化学物質、粉塵等による大気汚染が顕著となり、それに伴い気管支喘息の患者数が増えている。

15 気管支喘息とは、発作時に気管支平滑筋の収縮・攣縮が起こり、重積発作時は大変苦しい呼吸困難の状態から喘息死に至る重篤な疾患である。気管支喘息は、大人はもちろん子供でも入院原因の筆頭に挙げられる程であるが、現在の医療では、個々の患者の喘息に対応した予防も治療も難しい疾患とされている。

20 気管支喘息は、一般的には化学伝達物質やその他の因子に対する気道過敏性等の体質的素因に、抗原刺激等〔例えば、ハウスダスト（家内塵）・ダニ、ペット、花粉、上記の排気ガス、化学物質、粉塵等〕の原因因子、寄与因子が加わって発症するものと考えられている。その病態生理は複雑で、様々な要因、例えば、活性化された好酸球やTリンパ球等の炎症細胞の気管支粘膜への浸潤、その際にTh2サイトカイン、特にインターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、インターロイキン-13 (IL-13)、及びグロースファクター、例えば血小板由来増殖因子 (PDGF)、神経増殖因子 (NGF)、変形増殖因子 (TGF- $\beta$ )、中でも特にTGF- $\beta$ が、一連の炎症反応を亢進化するのに重要な役割を果たしている等といった事実が多数の研究に

より示されているが、そのメカニズムの全容は未だ明らかとはなっていない。

炎症が頻発し、しかもその治療が不完全な状態で長期間続くと、例えば上皮下組織の線維化や、杯細胞、筋線維芽細胞の過増殖等が起こり、その結果、気管支は不完全修復 (remodeling: リモデリング) の形で再生する。ひとたび不完全修復が起きてしまうと、気管支粘膜は線維質に置き換わり、その弾力性を失うために、気道の可逆性が失われ、喘息の慢性化・難治化を招くこととなる。

現在このような慢性的な気管支喘息の治療には、副腎皮質ホルモン剤、いわゆるステロイド剤が主に使用されている。しかし、この薬剤は治療には有効ではあるが、その副作用が問題となっている。例えば、効力のある抗喘息薬として知られているグルココルチコステロイドは、実際は一時的な症状鎮静効果しか有せず、その代償として周知の副作用、例えば骨粗鬆症、肥満、高血圧、糖尿病等を伴う [例えば、Barnes, P. J., "A new approach to the treatment of asthma", USA, N Engl J Med, Massachusetts Medical Society, 321, p1517-1527 (1989) 参照。]。そのステロイドによる副作用を軽減すべく開発された吸入ステ

ロイド療法も、合併症を発症する等の危険がある [例えば、Toogood, J. H., "Influence of dosing frequency and schedule on the response of chronic asthmatics to the aerosol steroid, budesonide", Journal of Allergy and Clinical Immunology, USA, 70, p388-398 (1982) 参照。]。特にステロイドの副作用がひどい患者向けにはステロイド代替薬として低用量メトトレキセートが提案されてきた [例えば、Mullarkey, M. F., "Methotrexate in the treatment of corticosteroid-dependent asthma. A double-blind crossover study", N. Engl. J. Med., USA, Massachusetts Medical Society, 318, p603-607 (1988) 参照。] が、メトトレキセートそれ自体がかなりの毒性を有している。

また、気管支を拡張させる即効性のある薬剤、例えば  $\beta$  2 刺激剤等もあるが、これは心臓にも作用するので、心臓疾患のある患者には用いる事ができず、しかも使用回数が制限される。

従って、既存のどの抗喘息剤又は喘息療法も、その効果及び安全面において不完全で、かつ持続的な寛解は報告されていない。よって患者に無害で、しかも持続的な抗炎症効果を奏するような気管支喘息の治療剤及び療法が必要とされている。

5 肝細胞増殖因子 (HGF) とは、N末端ヘアピンドメインと4つのクリングルドメインからなる $\alpha$ 鎖と、 $\beta$ 鎖とで構成されるヘテロダイマータンパクをいう。HGFは、種々の上皮細胞系において、上皮一間葉相互作用の仲介役を担う重要な因子であることが知られている。例えば、HGFは、腫瘍細胞の浸潤、転移等を誘発するマイトゲン活性、モートゲン活性、モルフォゲン活性及び血管新生作用を有することが知られている〔例えば、Nakamura T., “Purification and sibunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets”, FEBS letters, USA, 224, p311-316 (1987), Jiang. W. G et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol., 29, p209-248 (1999)参照。〕。また、HGFをヒト等に投与することにより、肝臓、腎臓、肺や心筋の線維化（例えば肝臓では肝硬変）の発症を防10 いだり、進行を阻止したりできることも知られている〔例えば、Ueki K. et al., “ Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats”, Nature Medicine, 5, p226-230 (1999)参照。〕。

15

HGFは、上述したように様々な生物活性を有するが、喘息による気道の炎症を抑制する効果をも有することはこれまでに全く知られておらず、本発明において初めて明らかとなった。

20 従って、本発明は、このHGFの気道炎症抑制効果を発見した点において重要な発明であり、しかも本発明の喘息治療剤は、その構成成分を生体由来のHGFとする点で、上記したステロイド剤等を用いるよりも生体に安全で、しかもその投与による副作用発症の危険性がないため、非常に優れた発明であると言える。

## 発明の開示

本発明は喘息治療剤、詳しくは、気管支喘息における炎症反応を極めて有効に抑制するHGFを含有し、しかも投与による副作用がなく、生体に安全な喘息治療剤を提供することを目的とする。

5 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた。具体的には、本発明者らは、抗原吸入暴露した卵白アルブミン感作マウスにHGFを投与すると、炎症時に見られる好酸球やリンパ球等の炎症細胞の浸潤が阻止され、しかも気管支肺胞洗浄液中のIL-4、IL-5並びにIL-13等のTh2サイトカイン及び血小板由来増殖因子(PDGF)、神経増殖因子(NGF)等のグローバスファクターの濃度の上昇が顕著に抑制されるということを発見し、喘息等の気道炎症の治療・予防にHGFを用いることが有効であることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて更なる検討を重ね、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- 15 (1) HGF又はその塩を有効成分として含有する喘息の予防又は治療剤、
- (2) HGFが、配列番号：1又は2で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、配列番号：1又は2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含むペプチド又はこれらの部分ペプチドであることを特徴とする前記(1)に記載の喘息の予防又は治療剤、
- 20 (3) HGFをコードするDNAを有効成分として含有する喘息の予防又は治療剤、
- (4) HGFをコードするDNAが、配列番号：3又は4で表される塩基配列又は配列番号：3又は4で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下ハイブリダイズする塩基配列を含むDNAであることを特徴とする前記(3)に記載の喘息の予防又は治療剤、
- (5) HGFをコードするDNAが、組換え発現ベクターに挿入されている

ことを特徴とする前記（3）又は（4）に記載の喘息の予防又は治療剤、

（6）組換え発現ベクターが、アデノ随伴ウイルス（A A V）、アデノウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス（H I V）、センダイウイルス、エプスタイン-バーウイルス（E B V）、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、S V 4 0、p C A G G S、p B K-C M V、p c D N A 3. 1 又はp Z e o S Vであることを特徴とする前記（5）に記載の喘息の予防又は治療剤、

（7）組換え発現ベクターが、更に宿主細胞に含まれていることを特徴とする前記（5）又は（6）に記載の喘息の予防又は治療剤、

（8）H G FをコードするD N A又はH G FをコードするD N Aを含む組換え発現ベクターが、リポソーム又はマイクロカプセルに含まれていることを特徴とする前記（3）～（7）のいずれかに記載の喘息の予防又は治療剤、

（9）更に薬剤学的に許容され得る担体を含むことを特徴とする前記（1）～（8）のいずれかに記載の喘息の予防又は治療剤、

（10）H G F又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することにより気管支の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療方法、

（11）H G FをコードするD N Aの有効量を、哺乳動物に投与することにより気管支の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療方法、

（12）気道の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療剤の製造のためのH G F又はその塩の使用、

（13）気道の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療剤の製造のためのH G FをコードするD N Aの使用、

に関する。

## 25 図面の簡単な説明

第1図は、気管支喘息モデルマウスにおいて、メサコリン吸入による気道過

敏性亢進に対するHGF投与の影響を示した図である。

第2図は、抗原の吸入暴露48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、気管支肺胞洗浄液（以下、BAL液と略す場合がある。）中炎症細胞数の増加に対するHGF投与の影響を示した図である。

5 第3図は、抗原吸入暴露48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、気管支周囲・血管周囲の組織内における浸潤炎症細胞数の増加に対するHGF投与の影響を、組織学的に観察した組織標本写真を示す図である。（a）は対照群（非感作／非暴露）、（b）は生理食塩水投与群（感作／暴露+生理食塩水）、（c）はHGF投与群（感作／暴露+HGF）を示す。

10 第4図は、抗原吸入暴露48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、気管支周囲・血管周囲の組織内における（a）浸潤総炎症細胞数及び（b）好酸球数の増加に対するHGF投与の影響を示した図である。

15 第5図は、抗原吸入暴露48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、気道上皮の粘液産生細胞（杯細胞）数の増加に対するHGF投与の影響を示す図である。（a）は対照群（非感作／非暴露）、（b）は生理食塩水投与群（感作／暴露+生理食塩水）、（c）はHGF投与群（感作／暴露+HGF）の気道上皮を組織学的に観察した組織標本写真を示す図である。（d）は前記各群における粘液産生細胞数を示し、（e）は前記各群における粘液含有量50%以上の細胞の数を示した図である。

20 第6図は、抗原吸入暴露48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、BAL液中のサイトカイン【（a）IL-4、（b）IL-5、（c）IL-13及び（d）IL-12】の濃度に対するHGF投与の影響を示した図である。

25 第7図は、抗原吸入暴露48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、BAL液中のグロースファクター【（a）PDGF、（b）NGF並びに（c）TGF- $\beta$ 】の濃度の上昇に対するHGF投与の影響を示した図である。

第8図は、抗原吸入暴露48時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、肺

組織中における TGF- $\beta$  の蓄積に対する HGF 投与の影響を、組織学的に観察した組織標本写真を示す図である。(a) は対照群（非感作／非暴露）、(b) は生理食塩水投与群（感作／暴露+生理食塩水）、(c) は HGF 投与群（感作／暴露+HGF）を示す。

5 第 9 図は、抗原吸入暴露 48 時間後の気管支喘息モデルマウスにおいて、血清中抗原特異的 IgE 抗体（抗 OVA 特異的 IgE）量の増加に対する HGF の影響を示した図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

10 本発明は、HGF 又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする。 HGF 又はその塩は、哺乳動物、例えばヒト、モルモット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等由来のいずれであってもよい。また HGF は、これらの哺乳動物の組織又は細胞、例えば成熟肝細胞や血小板等から抽出される精製タンパク質であっても、遺伝子組み換え技術等を用いて、H 15 GF をコードする DNA 又は RNA を導入された形質転換細胞等を培養し、産生されるタンパク質を精製することによって得られる組換えタンパク質であっても、また化学的に合成される合成ポリペプチドであってもよい。成熟肝細胞や形質転換細胞等からの HGF の抽出・精製又は合成ポリペプチドの製造は、それ自体公知の方法に従って行われて良い。

20 ヒト等の哺乳動物の細胞から HGF を単離・精製する方法としては、例えば、比較的高濃度に HGF を含むラット血小板をトロンビン処理し、血小板外へ分泌される HGF を取得後、イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンセファロースによるアフィニティクロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー等を用いて精製する方法等が挙げられる。

25 また、遺伝子組み換え技術等を用いて、HGF をコードする DNA 又は RNA を導入された形質転換細胞等を培養し、分泌されるタンパク質を精製するこ

とによってHGFを得る場合は、以下の方法に従って行うのがよい。

HGFをコードするDNA又はRNAを、適当な組換え発現ベクター、例えばpCAGGS (Gene, 108, 193-200 (1991)) 等に挿入し、これを宿主細胞に導入して形質転換体を構築する。

5 組換え発現ベクターを宿主へ導入する方法としては、自体公知の方法であればいずれも用いることができる。例えば、コンピテント細胞法 [J. Mol. Biol., 53, 154 (1970)]、DEAEデキストラン法 [Science, 215, 166, (1982)]、インピトロパッケージング法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, 581 (1975)]、ウイルスベクター法 [Cell, 37, 1053 (1984)]、マイクロインジェクション法 [Exp. Cell. Res., 153, 347 (1984)]、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [Science, 221, 551 (1983)]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]、プロトプラスト法 [特開昭63-2483942、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)]に記載の方法等を挙げることができる。

15 宿主としては、細菌、酵母、糸状菌、植物細胞、哺乳動物細胞等が挙げられる。例えば、細菌としては、エッシャリシア属 (Escherichia)、エンテロバクター属 (Enterobacter)、プロテウス属 (Proteus)、サルモネラ属 (Salmonella)、セラチア属 (Serratia)、バチラス属 (Bacillus)、ラクトバチラス属 (Lactobacillus)、ビフィドバクテリウム属 (Bifidobacterium)、シュードモナス属 (Pseudomonas)、ストレプトミセス属 (Streptomyces)、ストレプトコッカス属 (Streptococcus)、ロイコノストック属 (Leuconostoc)、ペディオコッカス属 (Pediococcus) 等が挙げられる。

酵母としては、サッカロミセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、NCYC191 25 3、NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris)、パン酵母等が挙げられる。糸状菌としては、アスペルギルス属 (Aspergillus)、ペニシリ

ウム属(*Penicillium*)等が挙げられる。

植物細胞としては、ワタ、トウモロコシ、ポテト、ソラマメ、ペチュニア、トマト、タバコ等が挙げられる。哺乳動物細胞としては、マウスC127細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、サルCOS細胞、マウス細胞BALB/5T3、マウスL細胞、マウスATT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒト細胞HeLa、ヒトFL細胞、ヒト胎児腎臓由来の293細胞[実験医学, 12, 316 (1994)]等が挙げられる。

得られた形質転換体は、HGFを産生するために、その宿主に応じた適切な培地で培養される。培地には該形質転換体の生育に必要な炭素源、無機物、ビタミン、血清及び薬剤等が含有される。

形質転換体の宿主が大腸菌の場合、LB培地(日本製薬)、M9培地[J. Exp. Mol. Genet., Cold Spring Laboratory, New York, 431 (1972)]等が、宿主が酵母の場合、YPD培地[Genetic Engineering, vol. 1, Plenum Press, New York, 117 (1979)]等が、宿主が動物細胞の場合、20%以下のウシ胎仔血清を含有するMEM培地、DMEM培地、PRM1640培地(日本製薬)等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。形質転換体の培養は、通常20℃~45℃、pHは5~8の範囲で行われ、必要に応じて通気・攪拌が行われるが、これらに限定されるものではない。また、宿主が接着性の動物細胞等の場合は、所望によりガラスビーズ、コラーゲンビーズ、アセチルセルロースフォローファイバー等の担体が用いられる。

HGFを産生している形質転換体は、その培養液上清中にHGFを分泌することから、この形質転換体の培養上清を用いてHGFの抽出を行うことができる。また、形質転換体中に産生されたHGFの抽出を行うこともできる。タンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するには、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム又は/及び凍結融解等によって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離や濾過に

よりHGFの粗抽出液を得る方法等が適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>等の界面活性剤が含まれていてもよい。このようにして得られた培養上清、あるいは細胞抽出液中に含まれるHGFの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析法、限外濾過法、ゲル濾過法及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等の主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が用いられる。

配列番号：1又は2で表されるアミノ酸配列は、HGFのアミノ酸配列の例である。配列番号：2で表されるアミノ酸配列は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列の161～165番目の5個のアミノ酸残基が欠失しているものであるが、配列番号：1又は2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は、両者ともヒト由来の天然HGFであって、HGFとしてのマイトゲン活性、モートゲン活性等を有する。

配列番号：1又は2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むペプチドとしては、配列番号：1又は2で表されるアミノ酸配列と少なくとも約70%以上、好ましくは約80%、更に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド、例えば配列番号：1又は2で表されるアミノ酸配列から、1～数個のアミノ酸残基を挿入又は欠失させたアミノ酸配列、1～数個のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基と置換させたアミノ酸配列、1～数個のアミノ酸残基が修飾されたアミノ酸配列等を含むペプチドであって、喘息時における気道炎症抑制作用を有するペプチドであることが好ましい。挿入されるアミノ酸又は置換されるアミ

ノ酸は、遺伝子によりコードされる20種類のアミノ酸以外の非天然アミノ酸であってもよい。

これらのペプチドは、単独であっても、挿入や欠失、置換等を組み合わせたアミノ酸配列を含有するペプチドであっても、またこれらの混合ペプチドであってもよい。  
5

本発明に用いられるHGFは、C末端がカルボキシル基 ( $-COOH$ )、カルボキシレート ( $-COO^-$ )、アミド ( $-CONH_2$ ) 又はエステル ( $-COOR$ ) のいずれであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチル等のC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロヘキシル、シクロヘキシル等のC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチル等のC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル等のフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチル等の $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基等のC<sub>7-14</sub>アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基等が用いられる。本発明で用いられるHGFが、C末端以外にカルボキシル基(又はカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化又はエステル化されているものも本発明におけるHGFに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステル等が用いられる。さらに、本発明に用いられるHGFには、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル等のC<sub>2-6</sub>アルカノイル基等のC<sub>1-6</sub>アシル基等)で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基等)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル等のC<sub>2-6</sub>アルカノイル基等のC<sub>1-6</sub>アシル基等)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質等の複合タンパク質等も含まれる。  
10  
15  
20  
25

本発明で用いるHGFの部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある。）としては、上記したHGFの部分ペプチドであればいずれのものであってもよい。本発明において、部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記したHGFの構成アミノ酸配列のうち少なくとも約20個以上、好ましくは約50個以上、より好ましくは約100個以上のアミノ酸配列を含有するペプチド等が好ましい。本発明の部分ペプチドにおいては、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）又はエステル（-COOR）のいずれであってもよい。さらに、部分ペプチドには、上記したHGFと同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したG1nがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチド等の複合ペプチド等も含まれる。

本発明に用いられるHGF又はその部分ペプチドの塩としては、酸又は塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、薔薇酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩等が挙げられる。

本発明に用いられるHGFの部分ペプチド又はその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいはHGFを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれでも良い。すなわち、HGFを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は、保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮

合方法や保護基の脱離としては、例えば、M. Bodanszky 及び M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)、Schroeder 及び Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年) 等に記載された方法が挙げられる。

5 また、反応後は通常の精製方法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶等を組み合わせて HGF の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

10 本発明は、HGF をコードする DNA をその有効成分として含有することもできる。

本発明で用いられる HGF をコードする DNA としては、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、上記した細胞・組織由来の cDNA、上記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミド等いずれであってもよい。また、上記した細胞・組織より total RNA 又は mRNA 画分を調製したものを用いて、直接 RT-PCR 法によって増幅し、得ることもできる。具体的には、HGF をコードする DNA としては、例えば、(a) 配列番号：3 又は 4 で表わされる塩基配列を有する DNA、又は (b) 配列番号：3 又は 4 で表わされる塩基配列を有する DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、HGF と実質的に同質の活性、例えばマイトゲン活性、モートゲン活性等を有するタンパク質をコードする DNA 等が挙げられる。なお、配列番号：3 又は 4 で表わされる塩基配列を有する DNA とハイブリダイズする DNA とは、例えば上記 DNA をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより

得られるDNAを意味する。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、約0.7～1.0M程度の塩化ナトリウム存在下、約65℃程度でハイブリダイゼーションを行った後、約0.1～2倍程度の濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる。）を用い、約65℃程度の条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。

上記の配列番号：3又は4で表される塩基配列を有するDNAとハイブリダイズするDNAとして具体的には、配列番号：3又は4で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNA等が挙げられる。ハイブリダイゼーションは、公知の方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning, A laboratory Manual, Third Edition (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001:以下、モレキュラー・クローニング第3版と略す。)に記載の方法等に従って行うことができる。また、市販のライプラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

本発明で用いられるHGFの部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAであればいかなるものであってもよい。また、上記のHGFをコードするDNAと同様に、ゲノムDNA、ゲノムDNAライプラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライプラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライプラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミド等いずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて、直接RT-PCR法によって増幅することもできる。具体的な本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては

、例えば、(a) 配列番号：3又は4で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、(b) 配列番号：3又は4で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下ハイブリダイズするDNAであって、HGFと実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNA、又は上記(a)或いは(b)の部分塩基配列を有するDNA等が挙げられる。

本発明で用いられるHGF又は部分ペプチドをコードするRNAも、逆転写酵素によりHGF又は部分ペプチドを発現することができるものであれば、本発明に用いることができ、本発明の範囲内である。また該RNAも公知の手段により得ることができる。

本発明に用いられるHGF又はその部分ペプチド(以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある。)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を含有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、又は適当なベクターに組み込んだDNAの中から、標識されたHGFの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて、ハイブリダイゼーションさせることによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング第3版に記載の方法等に従って行うことができる。また、市販のライプラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

また、公知のHGFの塩基配列情報から従来公知の方法を用いて化学合成によりクローニングすることもできる。化学合成法としては、例えば、フォスフォアミダイト法を利用したDNA合成機 model 1392(パーキン・エルマ一株式会社製)等のDNA合成機で化学合成する方法等が挙げられる。

DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-superExpress Km(宝酒造)、Mutan<sup>TM</sup>-K(宝酒造)等を用いて、ODA-LA PCR法、

gapped duplex 法、Kunkel 法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。クローニ化された本発明のタンパク質をコードするDNAは、目的によりそのまま、又は所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGA又はTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明に用いられるHGFをコードするDNA又はRNA（以下、本発明のDNA等と略記する場合がある。）は、細胞内でのその安定性を高めるため、また、もし毒性があるならその毒性をより小さなものにするために修飾されてもよい。このような修飾には、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, p247 (1992) ; Vol. 8, p395 (1992) ; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press (1993)等に記載された方法等が挙げられる。本発明のDNA等は、リポソーム又はミクロスフェア等に内包された特殊な形態で用いられてもよい。また、本発明に用いられるHGFをコードするDNA等は、塩基以外の他の物質が付加されたものであってもよい。前記他の物質としては、糖；酸又は塩基；リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体；又は、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロール等）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルムート、コレラ酸等）などが挙げられる。前記他の物質は、核酸の3'末端あるいは5'末端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。本発明のDNA等は、その末端が化学修飾されたものであってもよい。末端の修飾基としては、核酸の3'末端あるいは5'末端に

特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNase等のヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコール等のグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、  
5 それに限定されるものではない。

本発明に用いられるHGF或いはその部分ペプチドをコードするDNAは、組換え発現ベクターに含有されていてもよい。

組換え発現ベクターとしては、HGF又はその部分ペプチドを発現することができる発現ベクターが好ましい。

10 本発明に用いられる組換え発現ベクターは、例えば、HGFをコードする塩基配列を有するDNA断片を、適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

前記組換え発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pCR4、  
15 pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、λファージ等のバクテリオファージ、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アデノウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス（HIV）、センダイウイルス、エプスタイン-バーワイルス（EBV）、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV40等のウイルス等の他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neo等が用いられる。中でも、ウイルスが好ましく、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アデノウイルス、レトロウイルス、又はポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス（HIV）、センダイウイルス、エプスタイン-バーワイルス（EBV）、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイ  
20  
25

ルス、SV40等が好ましい。更にアデノ随伴ウイルス（AAV）若しくはアデノウイルス等を用いることがより好ましい。アデノウイルスには種々の血清型が存在するが、本発明では2型若しくは5型ヒトアデノウイルスを使用することが好ましい。

5 前記プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター等が挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等を用いるのが好ましい。

10 宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda P_L$ プロモーター、lppプロモーター等が、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーター等が好ましい。

15

発現ベクターには、以上その他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン等を有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えは、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある。）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある。）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHOを用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、所望により、宿主に合ったシグナル配列を発現ベクターに付加してもよい。宿主が

エシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列等が、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列等が、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列等、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列等がそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターを宿主に導入することにより、形質転換体を製造することができる。

上記HGF或いはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する組換え発現ベクターは、更に宿主細胞に導入されていてもよい。

上記組換え発現ベクターの宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、ビフィズス菌、乳酸菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞等が用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、Escherichia coli K12・DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160 (1968)]、JM103 [Nucleic Acids Research], 9巻, 309 (1981)], JAZ221 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459 (1969)], C600 [Genetics, 39巻, 440 (1954)], DH5 $\alpha$  [Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990)], DH10B [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87巻, 4645-4649 (1990)] 等が用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、Bacillus subtilis M114 [Gene, 24巻, 255 (1983)]、[Journal of Biochemistry, 95巻, 87 (1984)] 等が用いられる。

ビフィズス菌としては、例えば Bifidobacterium longum、Bifidobacterium bifidum、Bifidobacterium breve 等が挙げられる。乳酸菌としては、例えばラクトバチラス属 (Lactobacillus)、ストレプトコッカス属 (Streptococcus)、ロイコノストック属 (Leuconostoc)、ペディオコッカス属 (Pediococcus) 等が挙げられる。酵母としては、例えば Saccharomyces cerevisiae AH22、AH

22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036, *Pichia pastoris* 等が用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup> 細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞又は*Estigmene acrea* 由来の細胞等が用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) 等が用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、*In Vivo*, 13, p213-217 (1977)) 等が用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫等が用いられる (前田ら、*Nature*, 315, 592 (1985))。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記する。)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記する。)、マウスL細胞、マウスATT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞等が用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, p2110 (1972) や *Gene*, 17, p107 (1982) 等に記載の方法に従って行うことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、*Molecular & General Genetics*, 168, p111 (1979) 等に記載の方法に従って行うことができる。酵母を形質転換するには、例えば、*Methods in Enzymology*, 194巻, p182-187 (1991)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, p1929 (1978) 等に記載の方法に従って行うことができる。

昆虫細胞又は昆虫を形質転換するには、例えば、*Bio/Technology*, 6, p47-55 (1988) 等に記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコール, p263-267 (1995)

(秀潤社発行)、*Virology*, 52巻, p456 (1973) 等に記載の方法に従って行うことができる。このようにして、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。宿主がエシエリヒア属菌又はバチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖等、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカーやペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液等の無機又は有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム等が挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子等を添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシエリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Miller, *Journal of Experiments in Molecular Genetics*, p431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシエリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, p4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, p5330 (1984)] 等が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞又は昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, p788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたもの等が用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [Science, 122, p501 (1952)], DMEM培地 [Virology, 8, p396 (1959)], RPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, p519 (1967)], 199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, p1 (1950)] 等が用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜又は細胞外にHGFを生成せしめることができ、生体に有効にHGFを投与することができる。

組換え発現ベクターを宿主細胞に形質転換せず、裸のベクターとして生体に *in vivo* 導入し、本発明に用いることもできる。裸のベクターとして用いる場合、使用される組換え発現ベクターとしては、pCAGGS [Gene, 108, p193-200 (1991)], pBK-CMV, pCDNA3.1, pZeoSV (インピトロゲン社、ストラジーン社) 等のプラスミドを用いることができる。該ベクターにも、前記SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター等、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン等を含有させることができる。

また、HGFをコードするDNA等又はHGFをコードするDNAを有する組換え発現ベクターを、リポソーム、マイクロカプセル、サイトフェクチン、DNA—タンパク質複合体、バイオポリマー等の人工ベクターに含有させることもできる。

リポソームとは、内部に水層を有する脂質二重膜でできた閉鎖小胞体であり、その脂質二分子膜構造が、生体膜に極めて近似していることが知られている。リポソームを製造するに際し使用されるリン脂質としては、例えば、レシチン、リゾレシチン等のホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール等の酸性リン脂質、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン等のスフィンゴリン脂質等が挙げられる。また、コレステロール等を添加することもできる。リポソームは、自体公知の方法に従って製造することができる。リポソームには、膜融合リポソーム、HVJ—膜融合リポソーム [Kaneda. Y et al., Biol. Chem, 264, p12126-12129 (1989)、Kato. K et al., Biol. Chem, 266, p3361-3364 (1991)、Tomita. N et al., Biochem. Biophys. Res., 186, p129-134 (1992)、Tomota. N et al., Cric. Res., 73, p898-905 (1993)]、陽イオン性リポソーム（特表平 2000-510151 号公報、特表平 2000-516630 号公報）等が知られている。センダウイルス（HVJ）と融合させたHVJ—膜融合リポソームを用いることは、特に好ましい。リポソームの表面にHVJの糖タンパクを組み込み、又は共有結合させてポリエチレングリコール等を添加すると、細胞への遺伝子導入効率が上昇する。

HGFをコードするDNAにシグナル配列、プロモーター及びポリアデニル化配列を付加したDNAをリポソーム中に含有させることにより、また、HGFをコードするDNAを含む組換え発現ベクターをリポソーム中に含有させることにより、本発明の喘息の予防・治療剤とすることができます。

マイクロカプセルはフィルムコートされた粒子であり、膜形成ポリマー誘導体、疎水性可塑剤、表面活性剤又は／及び潤滑剤窒素含有ポリマーの混合物からなるコーティング材料でコートされた粒子等で構成される。

HGFをコードするDNAにシグナル配列、プロモーター及びポリアデニル化配列を付加したDNAをマイクロカプセル中に含有させることにより、また、HGFをコードするDNAを有する組換え発現ベクターをマイクロカプセル中

に含有させることにより、本発明の喘息の予防・治療剤とすることができます。

HGF又はその塩等を直接投与するか、又はHGFをコードするDNA等を投与し、HGFを投与部位において発現させることにより、投与された生体の気管支炎の炎症等を抑制することができる。それ故、(a) HGFもしくはその部分ペプチド又はそれらの塩、又は(b) HGFもしくはその部分ペプチドをコードするDNAもしくはRNAは、喘息の予防・治療剤として使用することができる。

前記「喘息」とは、いわゆるアレルギー性の慢性気道炎症や気道過敏性亢進(AHR)等に関係する一連の症候群をいう。本発明の喘息の予防、治療剤は、急性・一過性又は慢性の喘息の両方において有効であり、小児喘息においてもその効果を発揮する。喘息の原因が、例えばウイルス感染(いわゆる風邪)、アレルゲン、化学物質によるもの等のいかなる場合であっても、また特に小児喘息においては、アトピー型であろうと非アトピー型であろうと、これらの予防・治療に有効に使用することができる。

本発明の喘息の予防・治療剤がHGFからなる場合は、常套手段に従って製剤化することができる。一方、HGFをコードするDNA等を該予防・治療剤として使用する場合は、上述した通り、該DNA等を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター又はアデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。本発明のDNA等は、そのままあるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することもできる。

例えば、HGF若しくはその塩又はHGFをコードするDNA等は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等として経口的に投与したり、患部、皮下、筋肉内等に埋め込むこともできる。また、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液又は懸濁液

剤等の注射剤の形で非経口的に投与することもできる。本発明の喘息の予防又は治療剤は、ネブライザーや吸入剤（ポケット型ネブライザ）の形で投与することができる。ネブライザによる投与に際しては、好ましくは電動式ネブライザ（例えばジェット式ネブライザ、超音波式ネブライザ、メッシュ式のネブライザ等）が使用される。本発明の喘息の予防又は治療剤は、電動式ネブライザの器具の中に入れられ、加圧された空気の噴出によって液体の薬剤を霧状にし人の気道に噴霧されるか、超音波振動によって薬剤を噴霧し、気道に投与される。吸入剤による投与方法としては、本発明の喘息の予防又は治療剤を例えばスプレー等で直接噴霧する方法か、吸入補助器具（スペーサー）を使用して噴霧された薬剤を吸入する方法が挙げられる。

本発明の製剤は、例えば、HGF若しくはその塩又はHGFをコードするDNA等を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤又は徐放性を付与する物質等とともに混和することによって製造することができる。

錠剤、カプセル剤等において混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターク、トラガント、アラビアゴムのような結合剤；結晶性セルロースのような賦形剤；コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸等のような膨化剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤；ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤等が挙げられる。錠剤には、適当なコーティング剤（ゼラチン、白糖、アラビアゴム、カルナバロウ等）、腸溶性コーティング剤（例えば酢酸フタル酸セルロース、メタアクリル酸コポリマー、ヒドロキシプロピルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロース等）などで剤皮を施してもよい。カプセル剤の場合には、さらに油脂のような液状担体を含有することができる。

また、カプセル剤は、通常のカプセル剤の他、腸溶性コーティングカプセル剤、胃内抵抗性カプセル剤、放出制御カプセル剤とすることもできる。腸溶性カプ

セル剤とする場合、腸溶性コーティング剤でコーティングしたHGF又はHGFに上記の適当な賦形剤を添加したものをお通常のカプセルに充填する。あるいは、腸溶性コーティング剤でコーティングしたカプセル、若しくは腸溶性高分子を基剤として成形したカプセルにHGF又はHGFに上記の適当な賦形剤を添加したものをお充填することができる。

注射のための無菌組成物は注射用水性液又は油性液に有効成分を溶解又は懸濁させる等の通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウム等）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）等を併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。さらに、前記無菌組成物には、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノール等）、酸化防止剤等が配合されてもよい。調製された無菌組成物は通常、適当なアンプルに充填され、注射剤として供される。

また、ネブライザ用液剤や吸入剤として製造する場合、その添加剤としては、一般に吸入用製剤に使用される添加剤であればいずれのものであってもよく、例えば、上記した賦形剤、緩衝剤、溶解補助剤、保存剤、安定剤、等張化液、pH調整剤（塩酸、水酸化ナトリウム等）、及び矯味剤（クエン酸、メントール、グリチルリチンアンモニウム塩、グリシン、香料等）などが用いられる。吸入剤においては、前記添加剤に加え噴射剤が配合される。噴射剤としては、液化ガス噴射剤、圧縮ガス等が用いられる。液化ガス噴射剤としては、例えば、

フッ化炭化水素 (H C F C 2 2、H C F C - 1 2 3、H C F C - 1 3 4 a、H C F C 1 4 2 等の代替フロン類等)、液化石油、ジメチルエーテル等が挙げられる。圧縮ガスとしては、例えば、可溶性ガス (炭酸ガス、亜酸化窒素ガス等)、不溶性ガス (窒素ガス等) などが挙げられる。

5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物 (例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等) などに対して投与することができる。

本発明に用いられるH G F をコードするD N A 等を製剤化せずに生体に投与する場合は、公知の方法に従って行ってよいが、例えば、D N A を直接体内に導入する *i n v i v o* 法、又は投与されるヒト等からある種の細胞を体外に取り出して、これにD N A を導入し、その形質転換細胞を体内に戻す *e x v i v o* 法がある [日経サイエンス、4月号、20-45 (1994)、月間薬事、36、23-48 (1994)、実験医学増刊、12、15 (1994)]。それぞれの方法において、D N A を細胞に導入する方法としては、上述したようにアデノ随伴ウイルス、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター等の組換え発現ベクターに含有させて、該発現ベクター等を導入する遺伝子導入方法、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、D E A E デキストラン、リン酸カルシウム沈殿、遺伝子銃で担体 (金属粒子等) とともにD N A を細胞内に導入する方法等、自体公知の方法により細胞に導入する方法 [Wu et al., J. Biol. Chem. 267, 963-967 (1992)、Wu et al., J. Biol. Chem. 263, 14621-14624, (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 2726-2730 (1991)] が挙げられる。またリポソーム等を用いる場合には、リポソーム法、H V J - リポソーム法、陽イオン性リポソーム法、リポフェクチン法、リポフェクトアミン法等が挙げられる。

25 中でも、導入効率の観点から、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法が望ましい。

また、上記組換え発現ベクターを宿主細胞に導入し、該形質転換体を本発明の予防・治療剤とすることもできる。その場合は、例えば形質転換体をカプセル等に含有させてカプセル製剤として生体に投与することができる。

またH V J -リポソーム等のリポソームを用いる場合には、例えば、懸濁剤、  
5凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

本発明にかかる喘息の予防・治療剤は、経口的に投与したり、患部、皮下、筋肉内等に埋め込んだり、静脈投与することができるが、好ましくは静脈投与又は気管支に局所的に投与することが好ましい。

また本発明の喘息の予防・治療剤の投与時期は、喘息の症状が起こった時に投与されるのが好ましい。また喘息の慢性化、重症・難治化に繋がる危険性がある場合等には、継続的に投与され、気道の不完全修復（remodeling：リモデリング）を予防するのが好ましい。

本発明の予防・治療剤の投与量は、投与対象、症状、投与形態、処置期間等により異なるので一概には言えないが、通常、静脈投与の場合、H G Fとして、約250～1000μg/Kg/日、好ましくは約300～800μg/Kg/日、特に好ましくは、約300～550μg/Kg/日、またH G FをコードするDNA等として、約0.2～40,000μg/Kg/日、好ましくは約2～2,000μg/Kg/日である。

本発明の製剤を投与することにより、喘息の発作時における気道の炎症を抑制及び予防することができる。気道の炎症時には、通常「気管支平滑筋の収縮」「粘膜の浮腫」「分泌物の増加」等の変化が起こっていると考えられており、具体的な症状としては呼吸停止等が見られる。病理形態的には、肺組織への炎症細胞、例えば好酸球、Tリンパ球やマクロファージ等の浸潤、気道上皮組織における粘液産生細胞（杯細胞）の過増殖等により確認できる。また、血清中の抗原特異的IgE値が上昇し、更には、気管支肺胞洗浄液（以降、BAL液と略す場合がある。）中のT h 2サイトカイン、例えばIL-4、IL-5、IL

－13等やグロースファクター、例えば血小板由来増殖因子（PDGF）、神経増殖因子（NGF）、変形増殖因子（TGF- $\beta$ ）の濃度が上昇することが確認されている。

従って、本発明の製剤を投与すると、炎症時に見られる上記の現象が抑制される。

本発明の製剤の気道炎症抑制作用効果は、マウスを用いた抗原反復吸入暴露による実験的気管支喘息モデルを作成し、該マウスが気道の炎症反応を起こす環境下において本発明の製剤を該マウスに投与し、気道炎症及び気道過敏性亢進が抑制されることにより確認することができる。

10 気管支喘息モデルの作製は特に限定されないが、例えば、マウスに卵白アルブミン感作・吸入暴露を施して抗原特異的免疫性を付与する方法が挙げられる。この抗原誘発アレルギー性気道炎症モデルマウスに、例えばメサコリン（Methacholine）等の気道収縮作用を有する物質を吸入させることにより、気道炎症を引き起こさせることができる。

15 血清中抗原特異的IgE値の測定には、例えばELISA法（Temann, U. A., Am. J. Respir. Crit. Care. Mol. Biol., 16, p471-478, 1997）等を用いることができる。

20 BAL液中の炎症細胞を含む全BAL細胞数の測定は、例えば生理食塩水で肺胞内を洗浄し、得られたBAL液中に存在する細胞の数を顕微鏡下で計測することにより行うことができる。

BAL液上清中のIL-4、IL-5、IL-13等のサイトカインやPDGF、NGF、TGF- $\beta$ 等のグロースファクターの濃度の測定は、例えばELISA法により行うことができる。ELISAにおける比色計測定は、それぞれ添付の使用説明書に記載の方法に従って行うのがよい。

25 組織学的及び免疫組織学的に気道炎症を確認する方法としては、例えば、気管支周辺の肺組織を過ヨウ素酸シッフ染色後、顕微鏡下で粘液産生細胞（杯細

胞) の数を計測する方法、また気管支周辺の組織細胞をヘマトキシン-エオジン染色後、同じく顕微鏡下で好酸球、リンパ球又はマクロファージの数を計測する方法等が挙げられる。これらの計測には、NIH Image Analysis system(National Institute of Health, Bethesda, MD)等を用いることができる。また、  
5 気管支周辺組織細胞に、例えば抗TGF- $\beta$ ウサギIgGを吸着させ、その後アビシン-ビオチン処理(Ueki, T., et al. Nat. Med., 5, p226-230, 1999)することにより、細胞内のTGF- $\beta$ の蓄積を確認することができる。

以下に、実施例等を示して本発明を具体的に説明するが、言うまでもなく、  
10 本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 製造例

##### HGFを含有する製剤の製造

###### (1) HGF cDNAの作製

ヒトのMRC-5線維芽細胞からFast Track mRNA isolation kit  
15 (Invitrogen)を使用し、mRNAを単離し、これを使用してRT-PCR  
(reverse transcription/polymerase chain reaction)を行い、HGF cDNAを単離した。具体的には、mRNA溶液0.5  $\mu$ L (150 ng)、10×RT-PCR溶液 [500 mM KC1、100 mM トリス-HCl (pH 9.0)、1% Triton X-100、15 mM MgCl<sub>2</sub>] 5  $\mu$ L、dNTP (2.5 mM) 4  $\mu$ L、プライマー：1 (10 mM) 2  $\mu$ L、プライマー：2 (10 mM) 2  $\mu$ L、Taqポリメラーゼ(Takara) 0.5  $\mu$ L、RNasin (Promega) 0.5  $\mu$ L、逆転写酵素(Takara) 0.5  $\mu$ L及びDEPC処理H<sub>2</sub>O 35.2  $\mu$ Lを混合し、42°C 30分、95°C 5分で逆転写反応を行い、94°C 30秒、55°C 1分、72°C 1分のサイクルを40回繰り返し、さらに72°C 7分間反応させHGF cDNAを得た。このようにして得られたHGF cDNAをTA Cloning Kit (Invitrogen)を使用してpCRII

TMベクターにクローニングし、p C R I I / H G Fを得た。

なお、プライマー：a及びプライマー：bの配列は、以下の通りのとおりである。

プライマー：a；5' - CCCGTCCAGCGGTACCATGTGGGTGACC - 3' (配列番号5)

5 プライマー：b；5' - TACGGGATGGACTAGTTAGACTATTGTAG - 3' (配列番号6)

### (2) 組換え発現ベクターの構築

(1) で作製したp C R I I ベクターに組み込まれたH G F c D N Aを制限酵素 Kpn I / Spe Iで切断し、T 4 D N Aポリメラーゼ(Takara)処理により切断末端を平滑化させた。得られたH G F c D N A断片をあらかじめ制限酵素10 Xho Iで処理した後、切断末端を平滑化しておいたC H O細胞用発現ベクターp C A G G S - D H F Rと混合し、T 4 D N Aリガーゼで結合してH G F発現ベクターp C A G G S - D H F R / H G Fを得た。得られたH G F発現ベクターはニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターとウサギ $\beta$ -グロビンポリ(A)シグナル配列の間にH G F c D N Aを有する。また、形質転換された細胞の選択は、15 マウスジヒドロ葉酸還元酵素(D H F R)遺伝子にサイトメガロウイルス初期プロモーターとポリ(A)シグナル配列で連結したD H F Rキメラ遺伝子により可能となる。

### (3) チャイニーズハムスターC H O細胞への形質転換とその発現

上記C H O細胞発現用ベクターp C A G G S - D H F R / H G FはWiglerらの方法[Cell, 11, p233 (1977)]によりチャイニーズハムスターC H O細胞のD H F R欠損細胞に導入した。約30 $\mu$ gのp C A G G S - D H F R / H G Fプラスミドをそれぞれ240 $\mu$ Lの0.5M塩化カルシウムに溶解し、20mM H E P E S、280mM塩化ナトリウム及び1.5mMリン酸ナトリウムからなる2×H E P E S緩衝液(pH 7.1)240 $\mu$ Lを攪拌しながら加えた。室温で30分攪拌を続けプラスミドとリン酸カルシウムの共沈殿物を形成させた。続いて、10%ウシ胎仔血清(ギブコ社)と1%グルタミンとを含む25

$\alpha$ -MEM培地（フローラボラトリー社）を用いて  $5 \times 10^5$  個の CHO 細胞を 5 % CO<sub>2</sub> 存在下で 37 °C、24 時間培養した。培地交換した後、プラスミドとリン酸カルシウム共沈殿物を加え室温で 20 分間放置した。さらに、37 °C で 4 時間インキュベートした後、培地を除去し、15 % グリセリンを添加した 1 × HEPES 緩衝液を加え室温で 5 分間放置した。培地で細胞を洗浄した後、培地交換しさらに 37 °C で 7 日間培養して形質転換細胞を得た。得られた細胞株はリボヌクレオシドとデオキシリボヌクレオシドを含まず、透析した 10 % ウシ胎仔血清（ギブコ社）、2 % グルタミンを含む  $\alpha$ -MEM 培地（フローラボラトリー社）を用いて安定な HGF 高生産株を得るために 100 nM、250 nM、500 nM、750 nM、1 μM、2 μM とメソトレキセート濃度を順次追加させながら同培地で継代培養を繰り返した。得られた HGF 産生組換え細胞をクローニング選別を行い、安定な HGF 生産株を得た。

#### （4）形質転換 CHO 細胞培養上清からの HGF の精製

上記（3）で得られた HGF 産生チャイニーズハムスター CHO 組換え細胞株をリボヌクレオシドとデオキシリボヌクレオシドを含まず、10 % ウシ胎仔血清（ギブコ社）と 1 % グルタミンと 2 μM メソトレキセートを含む  $\alpha$ -MEM 培地（フローラボラトリー社）で培養し、その培養上清より、HGF を精製した。

##### イ) ヘパリンアフィニティークロマトグラフィー

HGF 産生チャイニーズハムスター CHO 組換え細胞株の培養液 1.2 L に最終濃度 0.01 % になるように Tween 80 を添加し、ステベックス HV フィルター（日本ミリポア）により濾過した。0.15 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 A (20 mM Citrate-NaOH, 0.01 % Tween 80, pH 6.5) で平衡化したヘパリンーセファロース CL-6B (ファルマシア製、カラム体積 50 mL) に添加した。0.5 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 A で洗浄後、0.5 M から 2.5 M の塩化ナトリウムによる直線濃度勾配

により溶出したピーク画分を集め、ヘパリン溶出液Aとした。

ロ) 陰イオン交換クロマトグラフィー

ヘパリン溶出液Aを100倍容の緩衝液B(20mM Tris-HCl、0.01%Tween 80、pH 8.0)で3回透析を行った後、緩衝液Bで平衡化したDEAE-セファロース(ファルマシア製、カラム体積40mL)に添加した。緩衝液Bで洗浄後、1M塩化ナトリウムを含む緩衝液Bで溶出したピーク画分を集め、DEAE溶出液とした。

ハ) ヘパリンアフィニティクロマトグラフィー(2回目)

DEAE溶出液を100倍容の緩衝液Aで3回透析を行った後、0.15M塩化ナトリウムを含む緩衝液Aで平衡化したヘパリン-セファロースCL-6B(ファルマシア製、カラム体積50mL)に添加した。0.3M塩化ナトリウムを含む緩衝液Aで洗浄後、0.3Mから2.5Mの塩化ナトリウムによる直線濃度勾配により吸着物を溶出した。HGFのピーク画分を集め、ヘパリン溶出液Bとした。精製されたHGFの収量は約12mgであり、培養上清液からの回収率は約50%であった。

二) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

HGFを2-メルカプトエタノール還元下及び非還元下でSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った。精製HGFは非還元条件下[2-ME(-)]では約50kDaを示し、還元条件下[2-ME(+)]では約67kDaを示した。

(5) 凍結乾燥剤の作製

生理食塩水100mL中に(4)で調整したHGF(1g)、マンニトール(1g)及びポリソルベート80(10mg)を含有する溶液を無菌的に調整し、1mLずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封して、本発明の製剤を凍結乾燥剤として調整した(製剤1)。

実施例

## HGF投与による気道炎症抑制効果の確認

## (1) 気道過敏性亢進におけるHGF投与の影響

雌の8～10週令マウス (BALB/c : Charles River Japan, Inc.) に卵白アルブミン (OVA) 非含有飼料を与え、一定温度、一定光サイクル下で飼育した。

気管支喘息モデルマウスを、以下に示す方法により作製した。

生理食塩水100μL中に20μgOVA (Grade V, Sigma, St. Louis MO) 及び2.25mg硫酸アルミニウム (乳化剤: AlumImuject; Piearce, Rockford, IL) を懸濁し、この懸濁液をマウスの腹腔内に、飼育開始0日後及び14日後に投与した。該マウスに、生理食塩水に1%のOVAを含む液を、超音波ネブライザーを用いて、20分間、OVAを吸入させた。吸入暴露は、飼育開始28、29及び30日後に行った。

気管支喘息モデルマウス作製中に、一部のマウスに製造例で得た製剤1を投与した。1mgの製剤1を10mLの生理食塩水に溶解・希釀後、該溶液0.2mLを飼育開始後27～31日の期間毎日、継続的に皮下投与した (HGF投与群、n=16: 感作/暴露+HGF)。製剤1の投与量は、HGFとして500μg/kg/日とした。

製剤1を生理食塩水に溶解して作成した溶液に代えて、生理食塩水0.2mLを、飼育開始後27～31日に継続的に皮下投与した群も作製した (生理食塩水投与群、n=16: 感作/暴露+生理食塩水)。また、上記のOVAによる感作・暴露を行わないマウスを、対照群 (n=16: 非感作/非暴露) とした。

尚、群間比較は、二元配置分散分析を行った後、生理食塩水投与群とHGF投与群との間 (\*), 又は対照群と生理食塩水投与群との間 (#) で、差を検定することにより行った (t検定)。以降の試験においても、同様に群間比較を行った。

気管支喘息モデルマウスにおける気道過敏性の評価は、以下に示す方法によ

り行った。メサコリン含有生理食塩水（3. 125～25 mg/mL）又は生理食塩水のみを超音波ネプライザー（NE-U07, OMRON社製）にて、気管支喘息モデルマウスのHGF投与群、生理食塩水投与群及び気管支喘息でない対照群にそれぞれ3分間吸入させた後、ホールボディープレチスマグラフボックス内にマウスを入れ、マウスが覚醒下かつ無拘束の状態で、バロメトリックプレチスマグラフ（Barometric plethysmography : Buxco Electronics Inc, Troy, NY）によるコンピューター呼吸機能解析システム（Buxco Electronics Inc., Troy, NY）を用いて気道過敏性（Penh）を測定した。Penhの測定は以下の式に従った。

10  $Penh = PEP/PIP \times Te-Tr/Tr$

PEP; peak expiratory pressure (mL/s), maximal positive box pressure occurring in one breath

PIP; peak inspiratory pressure (mL/s), maximal negative box pressure occurring in one breath

15 Te; expiratory time (s), time from end of inspiration to start of next inspiration

Tr; relaxation time (s), time of the pressure decay to 36% of total box pressure during expirations

(Cieslewicz. G et al., JCI, 104, p301-308 (1999)

20 その結果、各群において、生理食塩水のみを吸入した時に得られるベースラインPenh値には殆ど差がなかった（非感作／非暴露：0. 49±0. 04、感作／暴露+生理食塩水：0. 53±0. 17、感作／暴露+HGF：0. 53±0. 13）が、メサコリンを吸入した場合、生理食塩水投与群ではメサコリン濃度に依存して急激な気道過敏性の上昇が見られた。これに対しHGF投与群では、その気道過敏性の上昇が有意に抑制された（第1図）。

## （2）BAL液中炎症細胞数の測定

(1) に記載の試験 48 時間後、各群のマウスの気管支・肺胞内を、気管内チューブを介して生理食塩水 (1 mL、37°C) で 2 回洗浄した。洗浄液を回収し、全 BAL 液量及び BAL 液内の全細胞数を、Bürker-türk 式血球計算板を用いて測定した。次いで、BAL 液からサイトスピニ (Cytospin 3 : SHANDON 社製) を用いて単層標本を作製し (4,000 rpm、5 分)、これをメイ・ギムザ染色 (13 分) した。該組織単層標本を顕微鏡下において観察し、BAL 液中におけるマクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球等の炎症細胞数を測定した。

その結果、対照群においては、全 BAL 細胞数が少なく、またその内約 95 % 以上をマクロファージが占めており、他の炎症細胞は殆ど見られなかった。生理食塩水投与群においては、著しいリンパ球と好酸球の増加が見られた。これに対し、HGF 投与群では、生理食塩水投与群において見られたリンパ球と好酸球数の増加が有意に抑制されていた (第 2 図)。

### (3) 気管支周囲・血管周囲の組織内における浸潤炎症細胞数の測定

(2) の肺胞内洗浄後の右肺に 2 mL の空気を、気管内チューブを介して送り、右肺胞を膨らませ、10 % ホルマリンで、48 時間固定した。この固定組織から主気管支周辺の肺組織ブロックを切り出し、パラフィン固定した。ブロックから 4 μm 厚の組織切片を作製し、これらを顕微鏡スライド上に固定した後パラフィンを除去した。該組織検体スライドをヘマトキシン-エオジン染色し、明視化された炎症細胞の浸潤状況を顕微鏡下で観察した (最終倍率 × 400、インセット × 1,000)。炎症細胞数の計測には、NIH Image Analysis system (National Institute of Health, Bethesda, MD) 等を用いた。上記計測は、ランダムに選択した 10 視野に対して行い、組織 1 mm<sup>2</sup>当たりの細胞数の平均値を算出した。また試験に供した各群のマウスの数はそれぞれ 16 匹とした。

ヘマトキシン-エオジン染色は以下の通り行った。組織検体スライドを脱パラフィン後、ヘマトキシン液による染色を室温で 5 分間行い、37°C のぬるま

湯に5分間浸漬することにより余分な色素を洗い流した。次いで、検体を室温で95%アルコールに15秒浸し、親和させた後、水溶性エオジン液により対比染色を10分間行った。

その結果を第3図及び第4図に示す。対照群においては、殆ど気管支周囲・血管周囲組織に炎症細胞の浸潤は見られなかった〔第3図-(a)〕が、生理食塩水投与群においては、炎症細胞の浸潤が見られ〔第3図-(b)〕、炎症細胞数及び好酸球数が著しく増加した(第4図)。これに対し、HGF投与群では、生理食塩水投与群に比較して、炎症細胞の浸潤の程度が低く、炎症細胞数及び好酸球数の増加が抑制されていた(第3図-(c)、第4図)。

10 (4) 気道上皮組織における粘液産生細胞(杯細胞)数の測定

(3)の右肺固定組織から気道上皮組織を含む主気管支周辺の肺組織プロックを切り出し、組織検体スライドを作製した。該組織検体スライドを過ヨウ素酸シッフ染色し、明視化された杯細胞の数を顕微鏡下で計測した(最終倍率×1,000)。計測には、NIH Image Analysis system (National Institute of Health, Bethesda, MD)等を用いた。上記計測をランダムに選択した10視野に対して行い、気道上皮基底膜の単位長さ(1mm)当たりの細胞数の平均値を算出した。

また、細胞中の粘液含有量を、過ヨウ素酸シッフ染色により着色される色の濃さ(染色率)から判定し、粘液産生細胞を染色率が50%以上又は50%以下の2種類に分類した。

過ヨウ素酸シッフ染色は以下の通り行った。組織検体スライドを脱パラフィン後、検体を室温で1%過ヨウ素酸水溶液に浸漬し、酸化させた。流水で水洗後、検体をシッフ試薬により室温で10分間染色し、再び流水で十分水洗後、ヘマトキシリソ液により1分間の核染色を行った。

25 結果を第5図に示す。生理食塩水投与群〔第5図-(b)〕においては、対照群〔第5図-(a)〕に比べて粘液産生細胞の数が顕著に増加した〔第5図-(

d)]。これに対し、HGF投与群では、粘液産生細胞数の増加が抑制されており〔第5図- (c)、(d)〕、しかも粘液含有量50%以上の細胞の数も、生理食塩水投与群に比べて顕著に低く(生理食塩水投与群: 165±27個/mm、HGF投与群: 54±16個/mm)、各細胞内における粘液の分泌量も低下していることが確認された〔第5図- (e)〕。

#### (5) BAL液中サイトカイン及びグロースファクターの濃度測定

BAL液中のサイトカイン及びグロースファクターの濃度は、BAL液を遠心(4°C、3,000 rpm、10分間)して得られた上清を用いて測定した。IL-4、IL-5、IL-12、IL-13並びにPDGFは、R&D (Minneapolis, MN) のELISAキットを、またTGF- $\beta$ 又はNGFはそれぞれPromega (Madison, WI) 又はChemicon (Temecula, CA) のELISAキットを用いて、それぞれ添付の使用説明書に記載の方法に従って測定した。

結果を第6図及び第7図に示す。生理食塩水投与群においては、IL-4、IL-5及びIL-13のサイトカイン(第6図- (a)、(b) 及び (c))、並びにPDGF、NGF及びTGF- $\beta$ (第7図- (a)、(b) 及び (c))のいずれも、対照群に比べて顕著に濃度が上昇した。これに対し、HGF投与群では、これらの濃度の上昇が全て有意に抑制された。一方IL-12濃度は、対照群に比べ、生理食塩水投与群では低下したが、HGF投与群では有意に上昇した(第6図- (d))。

#### (6) 肺組織中におけるTGF- $\beta$ の蓄積

(2)の肺胞洗浄後の左肺を70%エタノールで12時間脱水した。脱水した左肺をパラフィン固定後、(3)と同様に組織検体スライドを作製した。組織検体に抗TGF- $\beta$ ウサギIgG (Promega, Madison, WI) を吸着させ(1:250)、次いで、アビジン-ビオチン免疫染色を施し、組織内のTGF- $\beta$ を明視化し、顕微鏡下(最終倍率×1,000)で観察した。

抗TGF- $\beta$ ウサギIgGの吸着は、4°C、12時間で行い、アビジン-ビオチン処理は、室温で60分間行った。パーオキシダーゼ標識ポリマー試薬の反応は遮光下で、室温、15分間行った。

その結果、生理食塩水投与群（第8図-（b））においては、対照群（第8図-（a））に比べて気道上皮及び炎症細胞の殆どが染色され、細胞内においてTGF- $\beta$ が産生されていることが確認された。これに対し、HGF投与群（第8図-（c））では、染色された細胞の数が生理食塩水投与群に比べて少なく、TGF- $\beta$ の産生が抑制されていることが確認された。

#### （7）血清中抗原特異的IgE抗体（抗OVA IgE）量の測定

各群のマウスの下大静脈より、血液サンプルを採取し、4°C、1,500 rpmで20分遠心し、血清サンプルを作製した。

96ウエルのプレート（NUNC IMMUNOPLATE I : Nunc）に、5  $\mu$ g/mLのモノクローナル抗マウスIgE抗体（Serotec）を含むPBS希釈液を100  $\mu$ L/wellで分注し、4°Cにて1晩反応させてプレートをコートした。その後、各ウエルを0.1%Tween20-PBS（-）（Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>を含まない）（洗浄用バッファー）にて5回洗浄し、1%BSA（和光純薬工業株式会社）-PBSを150  $\mu$ L/wellで加え、室温にて1時間インキュベートした。ついで、洗浄用バッファーにて5回洗浄し、各群のマウスの血清サンプルを100  $\mu$ L/wellずつ加え、室温にて1時間インキュベートした。同時に、標準曲線作成用として、あらかじめ総IgE抗体量測定の系で定量したモノクローナル抗OVA特異的IgE抗体を、1%BSA-0.1%Tween20-PBS（希釈バッファー）で各種濃度に希釈して、同一プレートの別のウエルに加えた。各ウエルを洗浄バッファーで5回洗浄した後、希釈バッファーで50倍に希釈したビオチン標識OVAを100  $\mu$ L/wellで加え、さらに室温で1時間インキュベートした。各ウエルを、洗浄バッファーで5回洗浄し、希釈バッファーで3000倍に希釈

したパーオキシダーゼ結合ストレプトアビジン (peroxidase conjugated streptavidin DAKO) を 100  $\mu$ L/well で加え、さらに室温で 1 時間インキュベートした。各ウエルを、洗浄バッファーで 5 回洗浄し、基質溶液 (0.1 M クエン酸、0.2 M NaHPO<sub>4</sub>、O-フェニレンジアミン、及び 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む。) を 100  $\mu$ L/well で加えて、室温暗所にて約 30 分間反応させた後、プレートの各ウエルの吸光度を 492 nm で測定した。

結果を第 9 図に示す。生理食塩水投与群においては、抗 OVA 特異的 IgE の濃度が、対照群に比べて著しく上昇した。これに対し、HGF 投与群では、抗 OVA 特異的 IgE の濃度の上昇が抑制された。

10

#### 産業上の利用可能性

本発明の喘息の予防・治療剤は、気道の炎症時に確認される炎症細胞の気道上皮及び上皮下への浸潤、Th2 サイトカイン及びグロースファクター等の気道組織内での濃度上昇等を抑制し、気管支喘息における炎症反応を極めて有効に抑制することができ、慢性喘息或いは重症・難治性喘息への移行を予防することができる。しかも、その有効成分を生体由来の HGF 又はその HGF をコードする DNA とすることから、生体に投与しても、従来のステロイド吸入において見られる様な副作用がない。従って本発明の喘息の予防・治療剤は、生体に非常に安全で有用である。

20

本出願は日本で出願された特願 2003-086268 を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含されるものである。

25

## 請求の範囲

1. HGF又はその塩を有効成分として含有する喘息の予防又は治療剤。

5 2. HGFが、配列番号：1又は2で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、配列番号：1又は2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含むペプチド又はこれらの部分ペプチドであることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の喘息の予防又は治療剤。

10 3. HGFをコードするDNAを有効成分として含有する喘息の予防又は治療剤。

15 4. HGFをコードするDNAが、配列番号：3又は4で表される塩基配列又は配列番号：3又は4で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含むDNAであることを特徴とする請求の範囲第3項に記載の喘息の予防又は治療剤。

5. HGFをコードするDNAが、組換え発現ベクターに挿入されていることを特徴とする請求の範囲第3項又は第4項に記載の喘息の予防又は治療剤。

20 6. 組換え発現ベクターが、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アデノウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス（HIV）、センダイウイルス、エプスタイン-バーウィルス（EBV）、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV  
25 40、pCAGGS、pBK-CMV、pCDNA3.1又はpZeoSVであることを特徴とする請求の範囲第5項に記載の喘息の予防又は治療剤。

7. 組換え発現ベクターが、更に宿主細胞に含まれていることを特徴とする請求の範囲第5項又は第6項に記載の喘息の予防又は治療剤。

5 8. HGFをコードするDNA又はHGFをコードするDNAを含む組換え発現ベクターが、リポソーム又はマイクロカプセルに含まれていることを特徴とする請求の範囲第3項～第7項のいずれかに記載の喘息の予防又は治療剤。

10 9. 更に薬剤学的に許容され得る担体を含むことを特徴とする請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の喘息の予防又は治療用医薬組成物。

10. HGF又はその塩の有効量を、哺乳動物に投与することにより気道の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療方法。

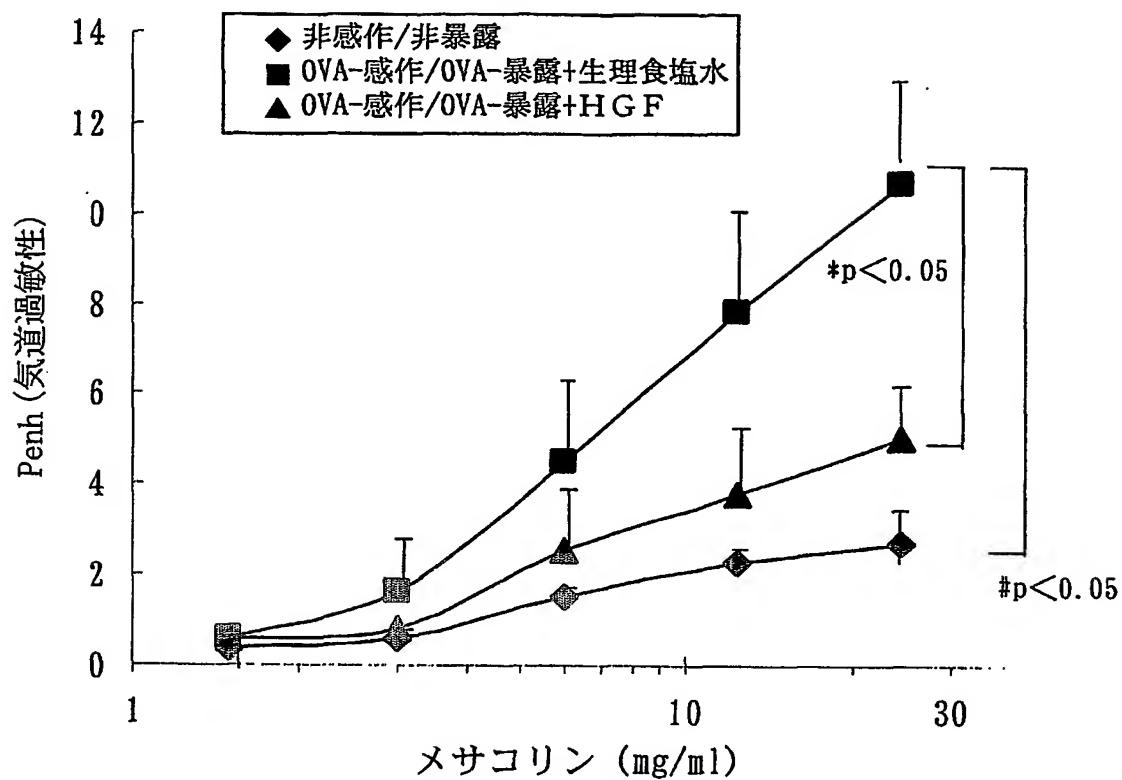
15 11. HGFをコードするDNAの有効量を、哺乳動物に投与することにより気道の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療方法。

12. 気道の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療剤の製造のためのHGF又はその塩の使用。

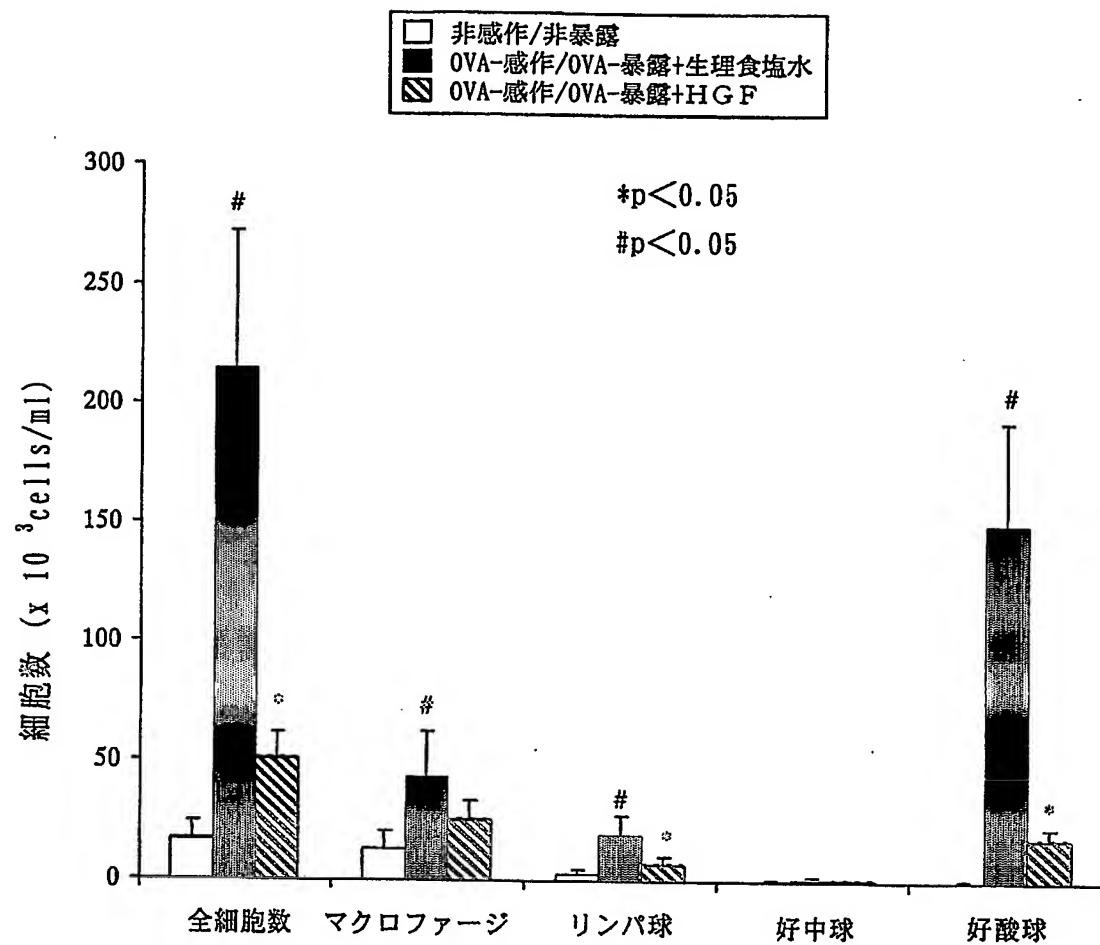
20

13. 気道の炎症を抑制することを特徴とする喘息の予防又は治療剤の製造のためのHGFをコードするDNAの使用。

第1図

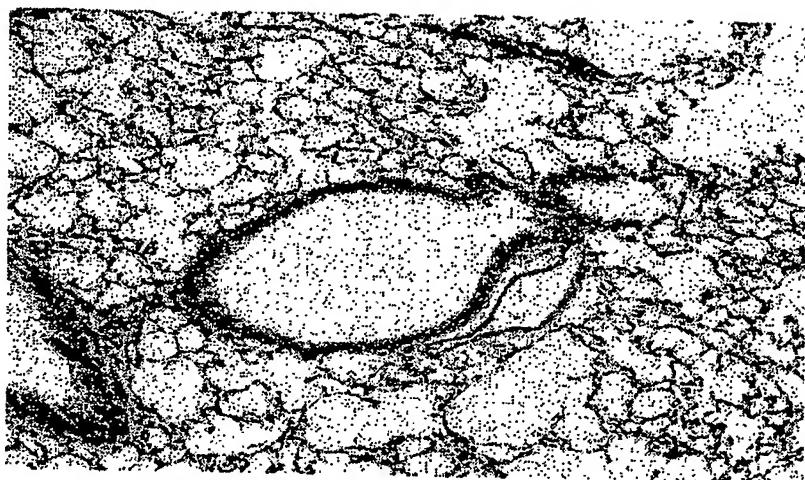


第2図

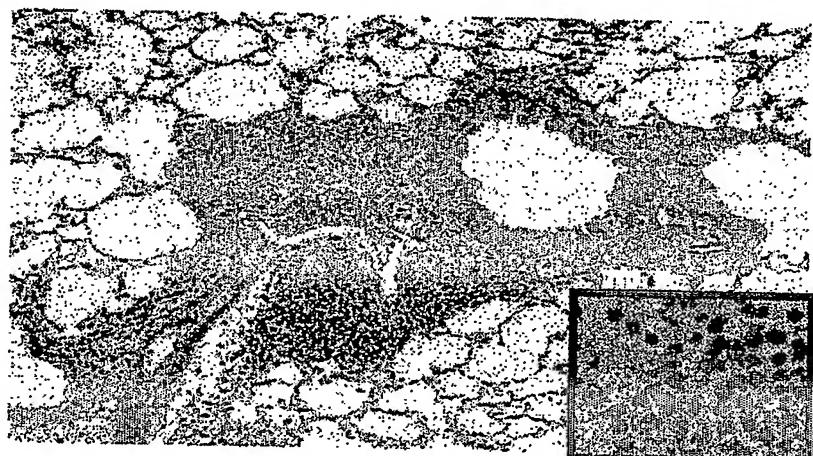


第3図

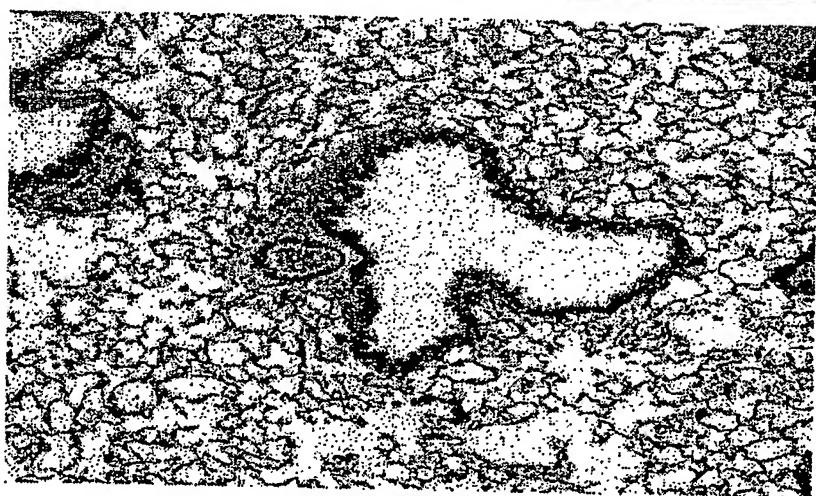
(a)



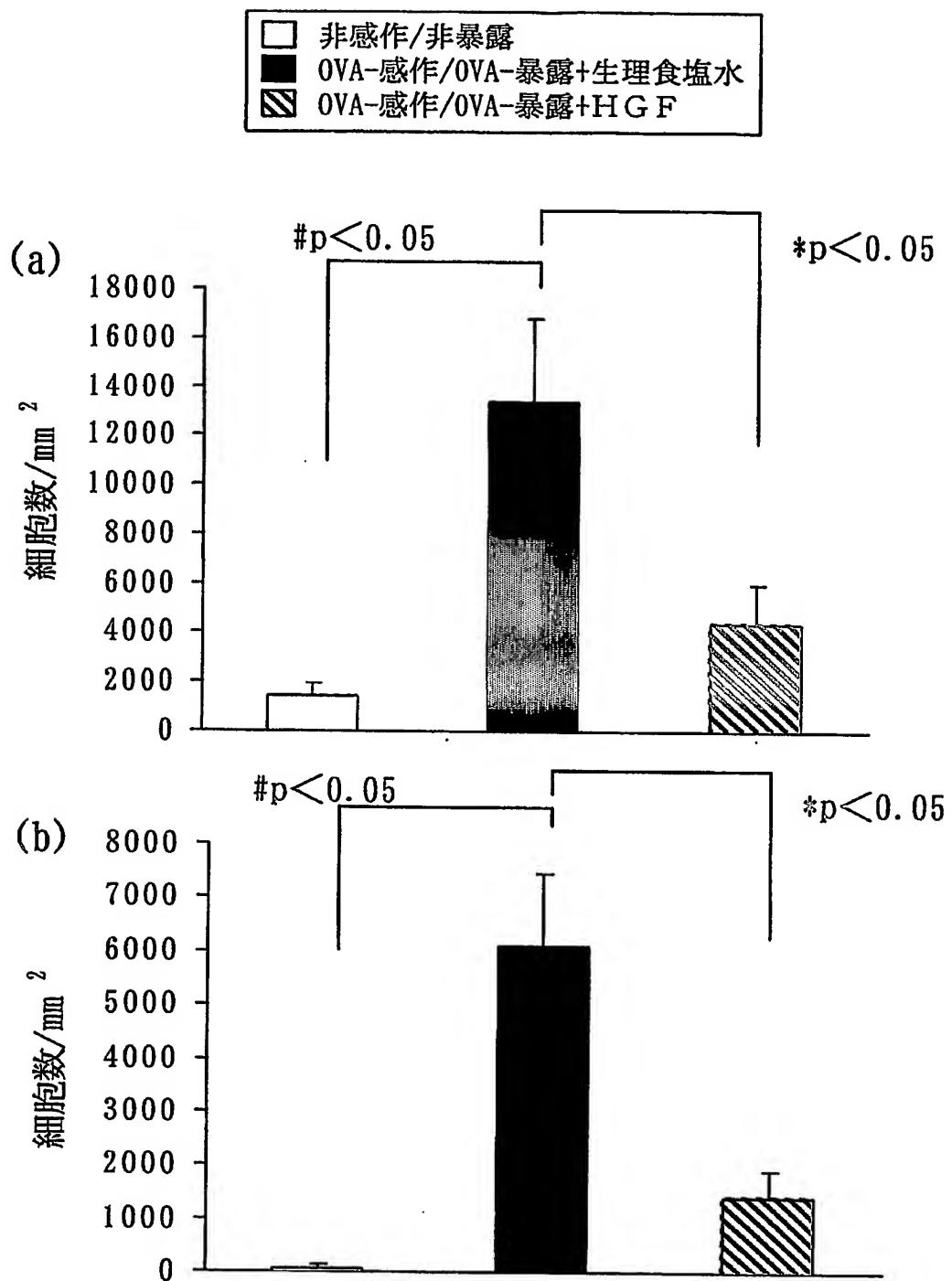
(b)



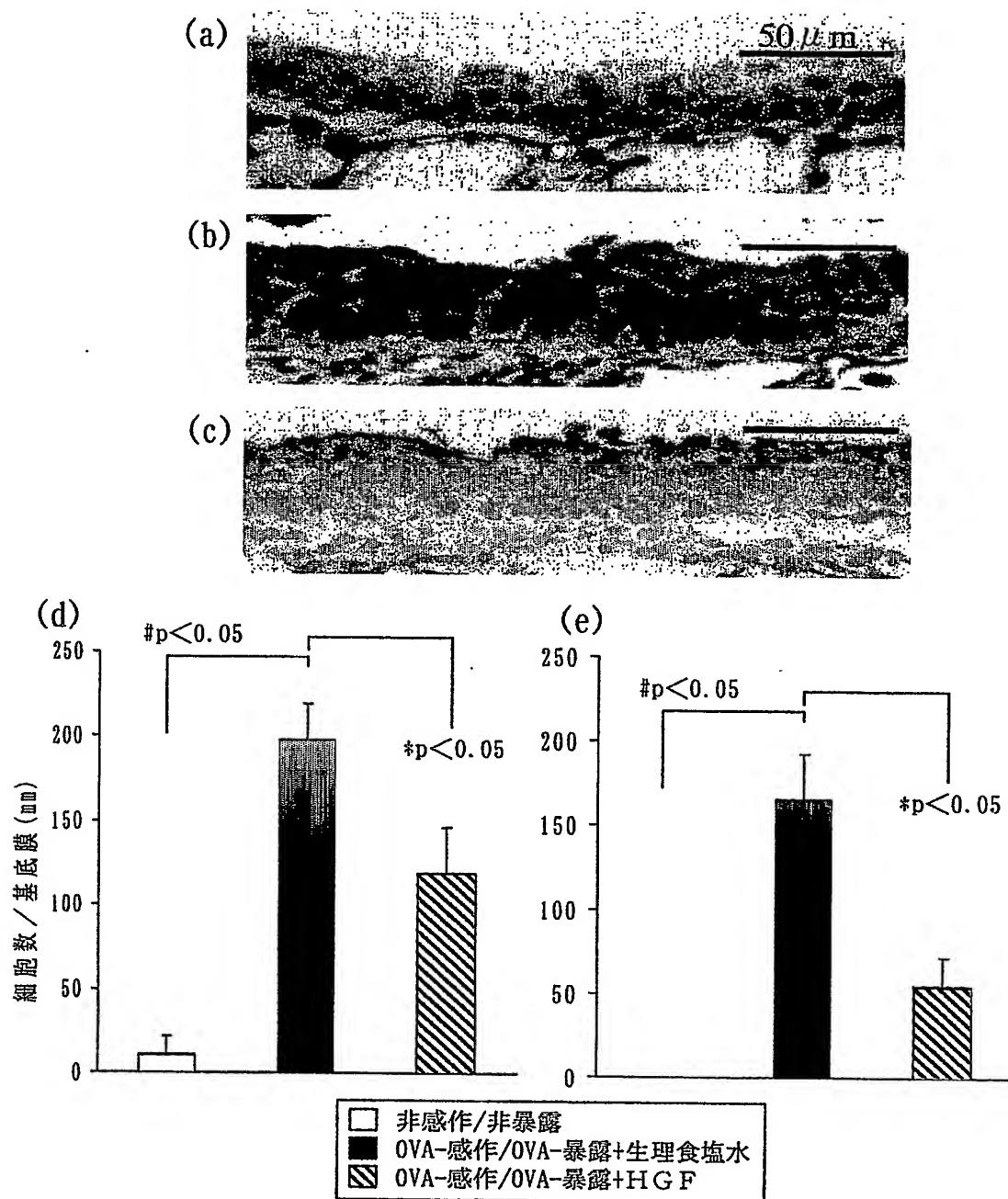
(c)



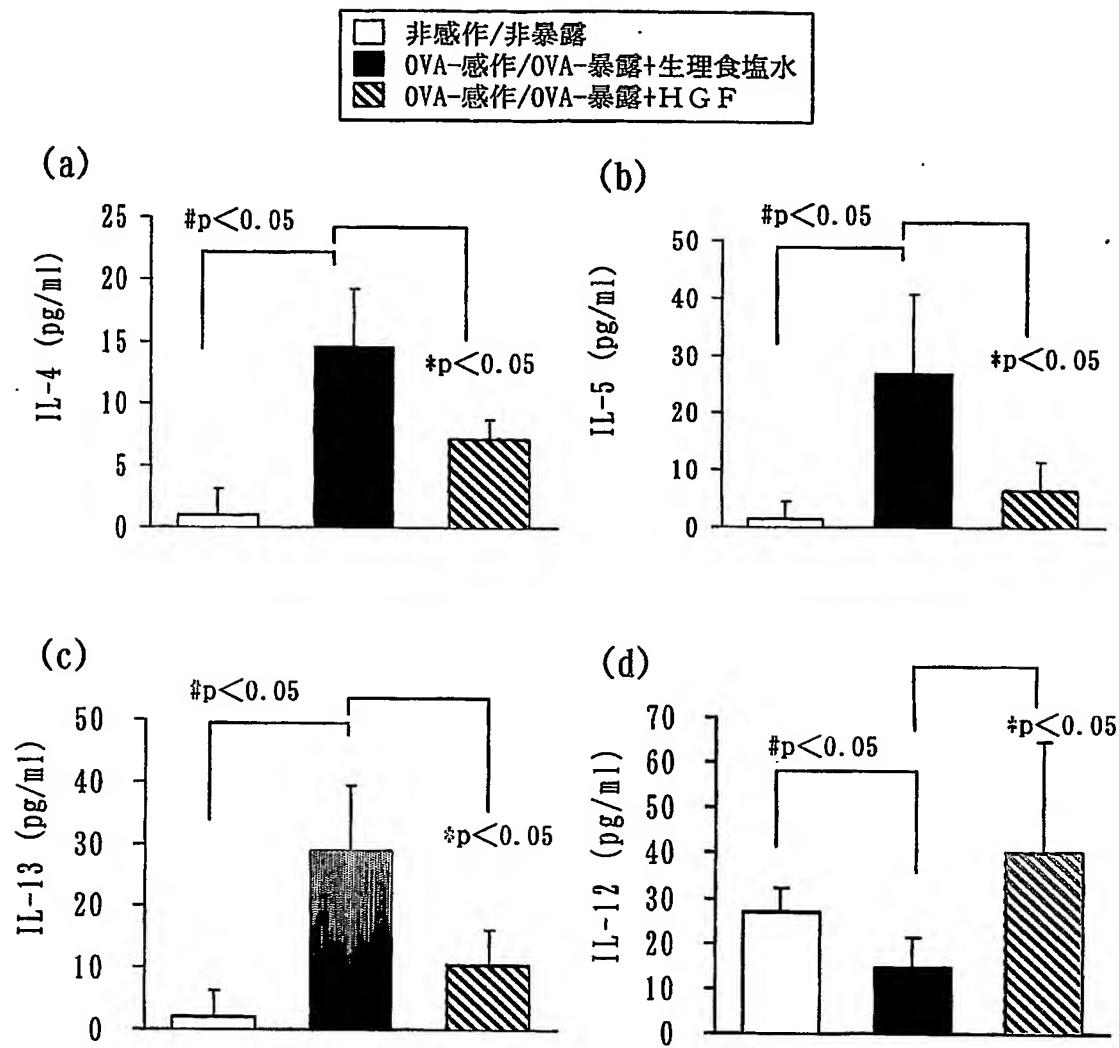
第4図



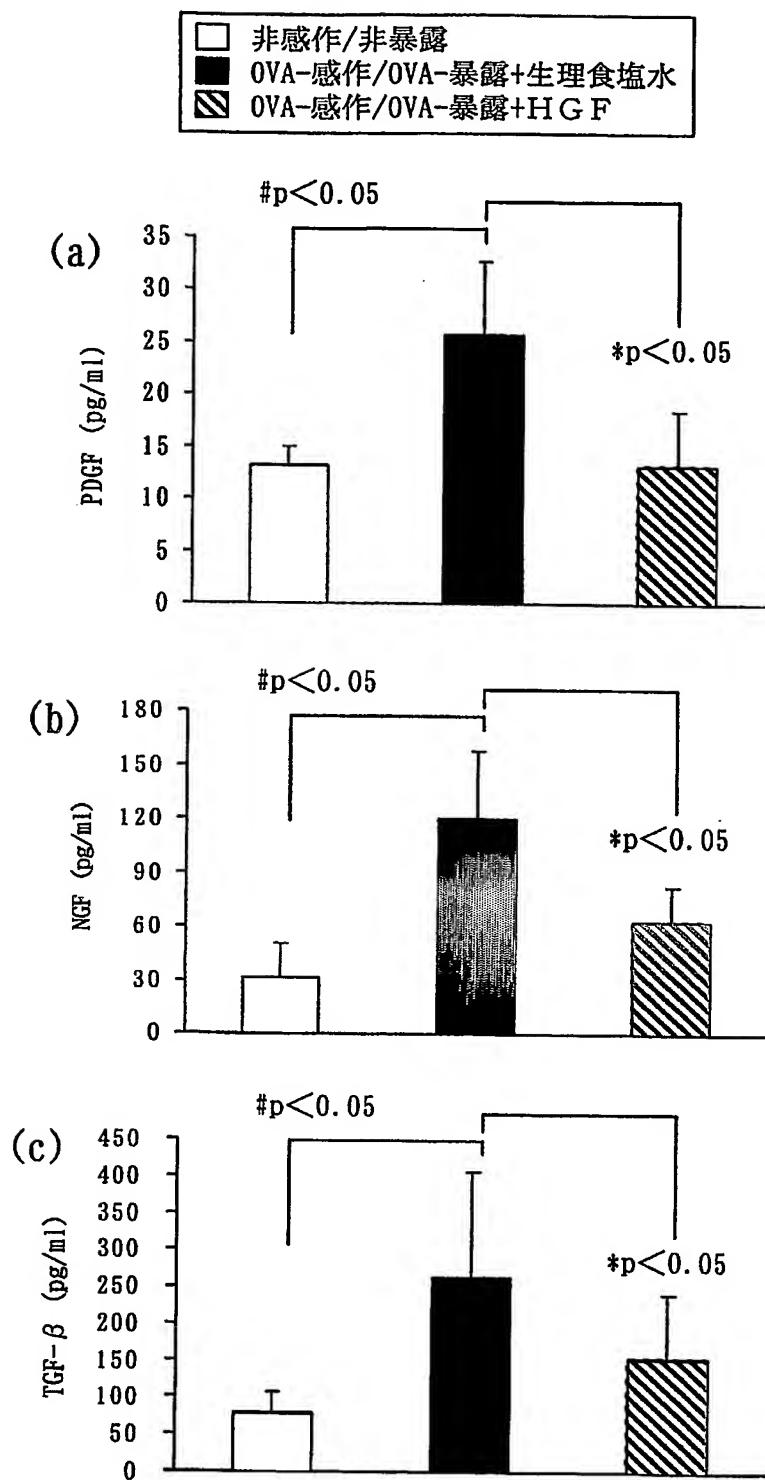
第5図



第6図

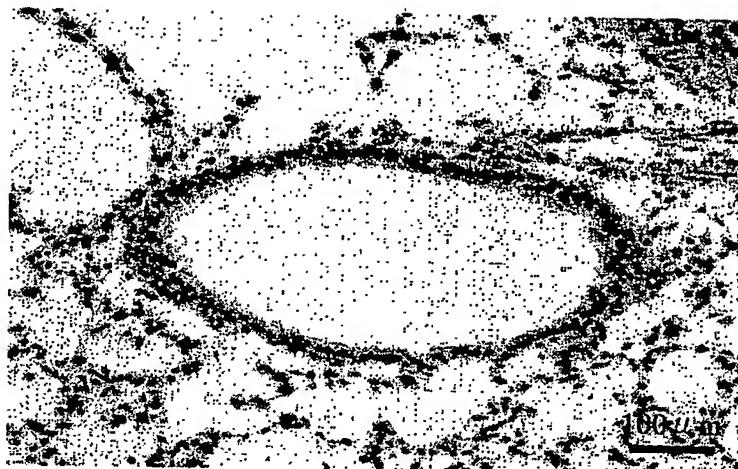


第7図



第8図.

(a)



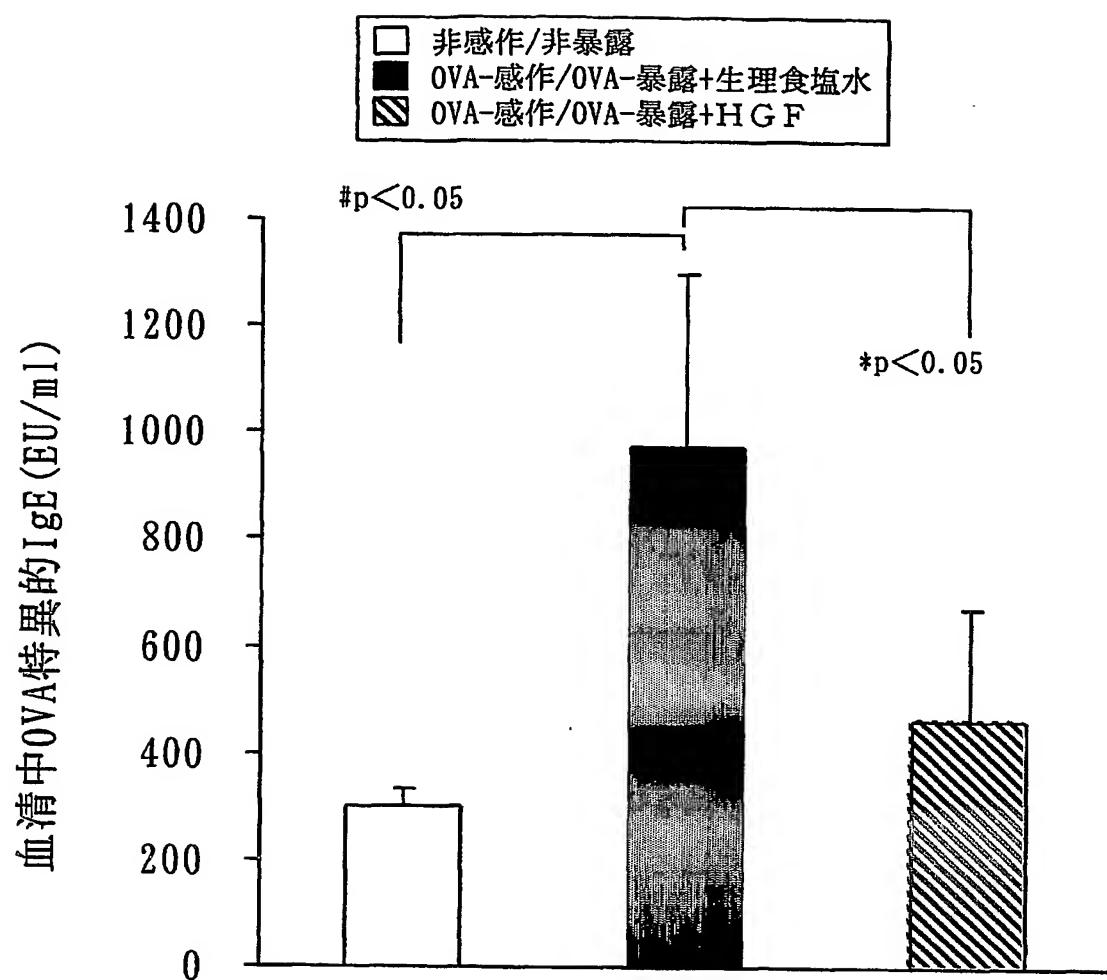
(b)



(c)



第9図



## SEQUENCE LISTING

<110> KRINGLE PHARMA CO., LTD.

<110> Nakamura, Toshikazu

5

<120> Prophylactic and therapeutic agents for asthma

<130> K12F1248

10 <160> 6

<210> 1

<211> 728

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Gln His Val Leu

1 5 10 15

20 Leu His Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln

20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr

35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val

25 50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr rg Asn Lys Gly Leu

65                    70                    75                    80  
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys  
                  85                    90                    95  
Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe  
5                    100                    105                    110  
Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys  
                  115                    120                    125  
Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys  
                  130                    135                    140  
10                    Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His  
                  145                    150                    155                    160  
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr  
                  165                    170                    175  
Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser  
15                    180                    185                    190  
Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu  
                  195                    200                    205  
Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp  
                  210                    215                    220  
20                    His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro  
                  225                    230                    235                    240  
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp  
                  245                    250                    255  
Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr  
25                    260                    265                    270  
Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys

	275	280	285
	Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu		
290	295	300	
	Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile		
5 305	310	315	320
	Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu		
	325	330	335
	His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn		
	340	345	350
10	Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr		
	355	360	365
	Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp		
	370	375	380
	Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met		
15 385	390	395	400
	Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp		
	405	410	415
	Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala		
	420	425	430
20	Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His		
	435	440	445
	Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys		
	450	455	460
	Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu		
25 465	470	475	480
	Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val		

	485	490	495
	Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg		
	500	505	510
	Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp		
5	515	520	525
	Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr		
	530	535	540
	Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys		
	545	550	555
10	560		
	Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly		
	565	570	575
	Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp		
	580	585	590
	Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu		
15	595	600	605
	Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn		
	610	615	620
	Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu		
	625	630	635
20	640		
	Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu		
	645	650	655
	Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp		
	660	665	670
	Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu		
25	675	685	685
	Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly		

690                    695                    700  
Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile  
705                    710                    715                    720  
Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser  
5                      725  
  
<210> 2  
<211> 723  
<212> PRT  
10 <213> Homo sapiens  
  
<400> 2  
Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Gln His Val Leu  
1                    5                      10                    15  
15 Leu His Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln  
20                    25                      30  
Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr  
35                    40                      45  
Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val  
20                    50                      55                    60  
Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu  
65                    70                      75                    95  
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys  
80                    85                      90  
25 Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe  
100                    105                    110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys  
115 120 125

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys  
130 135 140

5 Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His  
145 150 155 160

Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg  
165 170 175

Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg  
10 180 185 190

Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr  
195 200 205

Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly  
210 215 220

15 Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe  
225 230 235 240

Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg  
245 250 255

Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His  
20 260 265 270

Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met  
275 280 285

Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln  
290 295 300

25 Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro  
305 310 315 320

Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro  
325 330 335

Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro  
340 345 350

5 Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg  
355 360 365

Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln  
370 375 380

Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln  
10 385 390 395 400

Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp  
405 410 415

Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu  
420 425 430

15 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr  
435 440 445

Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys  
450 455 460

Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile  
20 465 470 475 480

Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr  
485 490 495

Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His  
500 505 510

25 Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg  
515 520 525

Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly  
530 535 540  
Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu  
545 550 555 560  
5 Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu  
565 570 575  
Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile  
580 585 590  
Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser  
10 595 600 605  
Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu  
610 615 620  
Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His  
625 630 635 640  
15 His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala  
645 650 655  
Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Pro Leu  
660 665 670  
Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro  
20 675 685 685  
Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val  
690 695 700  
Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val  
705 710 715 720  
25 Pro Gln Ser

<210> 3

<211> 2187

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtccicct gcatctcc 60  
ctgcicccccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat  
gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 120  
10 accaaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaataatagat gtactaggaa taaaggactt  
ccatttcactt gcaaggcttt tgttttgtat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc  
ttcaatagca tgtcaagtggtt agtggaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 180  
aacaagact acattagaaaa ctgcatttgcattt ggtaaaggac gcagctacaa gggAACAGTA  
tctatcacta agatggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgataacc acacgaacac 240  
15 agctttttgc cticgagcta tcgggttaaa gacctacagg aaaactactg tcgaaatcct  
cgaggggaag aagggggacc ctgggttttc acaagcaatc cagaggtacg ctacgaagtc  
tgtgacattc ctcaatgttc agaagttgaa tgcatgacct gcaatgggaa gagttatcga 300  
ggtcctatgg atcatacaga atcaggcaag atttgcacg gctggatca tcagacacca  
caccggcaca aattcttgc tgaaagatat cccgacaagg gctttagatga taattattgc 360  
20 cgcaatcccg atggccagcc gaggccatgg tgctatactc ttgaccctca cacccgc 420  
gagttactgtg caattaaaac atgcgtgac aatactatga atgacactga tgttcc 480  
gaaacaactg aatgcaccca aggtcaagga gaaggctaca gggcactgt caataccatt  
tggaatggaa ttccatgtca gcgttggat tctcgttac ctcacgagca tgacatgact 540  
cctgaaaatt tcaagtgcggaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct 600  
25 gaatcaccct ggtgttttac cactgtacca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt 660  
ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatatg 1140  
1200

ggcaacttat cccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtggacaa gaacatggaa 1260  
gacttacatc gtcataatctt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc 1320  
cgaaatccag atgatgatgc tcatggaccc tggtgctaca cgggaaatcc actcattcct 1380  
tgggattatt gccctatttc tcgttgtgaa ggtgatacca cacctacaat agtcaatita 1440  
5 gaccatcccg taatatcttg tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaaa tgggattcca 1500  
acacgaacaa acataggatg gatggtagt ttgagataca gaaataaaaca tatctgcgga 1560  
ggatcatiga taaaggagag tgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac 1620  
ttgaaagatt atgaagcttg gcttggatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa 1680  
tgcaaacagg ttctcaatgt ttcccgctg gtataggcc ctgaaggatc agatctggtt 1740  
10 ttaatgaagc ttgccaggcc tgctgtcctg gatgatttt gtagtacgat tgattacct 1800  
aattatggat gcacaattcc tgaaaagacc agttgcagtg ttatggctg gggctacact 1860  
ggattgatca actatgatgg cctattacga gtggcacatc tctatataat gggaaatgag 1920  
aaatgcagcc agcatcatcg agggaaaggig actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg 1980  
gctgaaaaga tggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggccact tttttgtgag 2040  
15 caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttcctg gtcgtggatg tgccattcca 2100  
aatcgccctg gtattttgt ccgagtagca tattatgcaa aatggataca caaaattatt 2150  
ttaacatata aggtaccaca gtcata 2187

<210> 4

20 <211> 2172

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

25 atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgctgcagc atgtcctcct gcatctcctc 60  
ctgctcccca tcgccatccc ctatgcagag ggacaaagga aaagaagaaa tacaattcat 120

gaattcaaaa aatcagcaaa gactacccta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa 180  
accaaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtacttaggaa taaaggactt 240  
ccatttcactt gcaaggcttt tgttttgat aaagcaagaa aacaatgcct ctggttcccc 300  
ttcaatagca tgcataatgg agtgaaaaaa gaatttggcc atgaatttga cctctatgaa 360  
5 aacaaagact acatttagaaa ctgcattt ggtaaaggac gcagctacaa gggAACAGTA 420  
tctatcacta agatggcat caaatgtcag ccctggagtt ccatgataacc acacgaacac 480  
agctatcggg gtaaagacct acaggaaac tactgtcga atccctcgagg ggaagaaggg 540  
ggaccctggt gtttccaaag caatccagag gtacgctacg aagtctgtga cattccctcag 600  
tgttcagaag ttgaatgcat gacctgcaat ggggagagtt atcgaggctt catggatcat 660  
10 acagaatcag gcaagatitg tcagcgctgg gatcatcaga caccacaccg gcacaaattc 720  
ttgcctgaaa gatatcccga caagggctt gatgataatt atgccgcaa tcccgatggc 780  
cagccgagggc catggtgctt tactcttgcac cctcacaccc gctgggagta ctgtgcaatt 840  
aaaacatgcg ctgacaatac tatgaatgac actgaigttc ctggaaac aactgaatgc 900  
atccaaggc aaggagaagg ctacaggggc actgtcaata ccatttggaa tggaaattcca 960  
15 tgtcagcgtt gggatttctca gtatccctcac gagcatgaca tgactccatg aaattcaag 1020  
tgcaaggacc tacgagaaaa ttactgccga aatccagatg ggtctgaatc accctggtgt 1080  
tttaccactg atccaaacat ccgagttggc tactgctccc aaattccaaa ctgtgataatg 1140  
tcacatggac aagattgtta tcgtggaaat ggcaaaaatt atatggcaa ctatcccaa 1200  
acaagatctg gactaacaatg ttcaatgtgg gacaagaaca tggaaagactt acatgtcat 1260  
20 atcttctggg aaccagatgc aagtaagctg aatgagaatt actgccaaa tccagatgt 1320  
gatgctcatg gaccctgggg ctacacggga aatccacatca ttccctggaa ttattgccct 1380  
atttcicgtt gtgaaggatgta taccacaccc acaatagtc attagacca tcccgtaata 1440  
tcttgcacca aaacgaaaca attgcgagtt gttaatggaa ttccaaacacg aacaaacata 1500  
ggatggatgg ttagttttag atacagaaat aaacataatc gcggaggatc atgataaag 1560  
25 gagagttggg ttcttactgc acgacagtgt ttcccttcg gagactgaa agattatgaa 1620  
gcttggcttg gaattcatga tgtccacggaa agaggagatg agaaatgcaa acaggttctc 1680

aatgtttccc agctggata tggccctgaa ggatcagatc tggttttaat gaagcttgcc 1740  
aggcctgctg tcciggaatga tttgttagt acgattgatt tacctaatta tggatgcaca 1800  
attcctgaaa agaccagttg cagttttat ggctggggct acactggatt gatcaactat 1860  
gatggcctat tacgagttggc acatctctat ataatggaa atgagaaatg cagccagcat 1920  
5 catcgaggga aggtgactct gaatgagtct gaaataatgtg ctggggctga aaagatgg 1980  
tcaggaccat gtgaggggga ttatggtggc ccacttgtt gtgagcaaca taaaatgaga 2040  
atggttcttg gtgtcattgttccctggcgtt ggatgtgcca ttccaaatcg tcctggatt 2100  
tttgtccgag tagcatatta tgcaaaatgg atacacaaaa ttatTTAAC atataaggta 2160  
ccacagtcat ag 2172

10 <210> 5

<211>

<212> Artificial sequence

<213>

15 <400> 5

cccggtccagc ggtaccatgt gggtgacc 28

<210> 6

20 <211>

<212> Artificial sequence

<213>

<400> 6

25 tacggatgg actagttaga ctattgtat 29

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004133

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/27, 48/00, 31/7011, 9/127, 9/50, 35/76, A61P11/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/27, 48/00, 31/7011, 9/127, 9/50, 35/76, A61P11/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-239182 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 05 September, 2000 (05.09.00), Claim 1; Par. Nos. [0005], [0009] (Family: none)	1-9,12,13
X	JP 11-512435 A (Genentech, Inc.), 26 October, 1999 (26.10.99), Page 11, lines 2 to 8 & AU 9671578 A & US 5855918 A & WO 97/09997 A1	1-9,12,13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 June, 2004 (16.06.04)Date of mailing of the international search report  
06 July, 2004 (06.07.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/004133

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material
    - a sequence listing
    - table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material
    - in written format
    - in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing
    - contained in the international application as filed
    - filed together with the international application in computer readable form
    - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2004/004133

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 10, 11  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 10 and 11 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17 (2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. C17 A61K38/27, 48/00, 31/711, 9/127, 9/50, 35/76, A61P1  
1/06

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. C17 A61K38/27, 48/00, 31/711, 9/127, 9/50, 35/76, A61P1  
1/06

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2000-239182 A (三菱化学株式会社) 2000.09.05, 請求項1、【0005】、【0009】段落参照 (ファミリーなし)	1-9, 12, 13
X	JP 11-512435 A (ジェネンテック インコーポレーテッド) 1999.10.26, 第11頁第2-8行参照 & AU 9671578 A & US 5855918 A & WO 97/09997 A1	1-9, 12, 13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 16.06.2004	国際調査報告の発送日 06.7.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 安川 聰 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C 3039

## 第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ  配列表  
 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット  書面  
 コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期  出願時の国際出願に含まれる  
 この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された  
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2.  さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 拡足意見：

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 10, 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 10, 11 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

## 第VIII欄 (iv) 発明者である旨の申立て (米国を指定国とする場合)

申立ては実施細則第214号に規定する以下の標準文書を使用して作成しなければならない。第VII欄と同様(i)～(iv)の備考の検査部分、及び本頁に特有の事項について第VII欄(iv)の備考を参照。この欄を使用しないときは、この用紙を顎書に含めないこと。

発明者である旨の申立て (規則4.17(iv)及び51の2.1(a)(iv))  
(米国を指定国とする場合)

私は、特許請求の範囲に記載され、かつ特許が求められている対象に関して、自らが最初、最先かつ唯一の発明者である（発明者が1名しか記載されていない場合）か、あるいは共同発明者である（複数の発明者が記載されている場合）と信じていることを、ここに申し立てる。

本申立ては、本書がその一部をなす国際出願を対象としたものである（出願時に申立てを提出する場合）。

本申立ては、国際出願PCT/\_\_\_\_\_を対象としたものである（規則26の3に従って申立てを提出する場合）。

私は、特許請求の範囲を含め、上記国際出願を検討し、かつ内容を理解していることを、ここに表明する。私は、PCT規則4.10の規定に従い、上記出願の顎書において主張する優先権を特定し、かつ、「先の出願」という見出しの下に、出願番号、国名又は世界貿易機関の加盟国名、出願日、出願月、出願年を記載することで、米国以外の少なくとも一国を指定しているPCT国際出願を含め、優先権を主張する本出願の出願日よりも前の出願日を有する、米国以外の国で出願された特許又は発明証の出願をすべて特定している。

先の出願：

\_\_\_\_\_

私は、連邦規則法典第37編規則1.56 (37 C.F.R. § 1.56) に定義された特許性に關し重要であると知った情報について開示義務があることを、ここに承認する。さらに、一部継続出願である場合、先の出願の日から一部継続出願のPCT国際出願日までの間に入手可能になった重要な情報について開示義務があることを承認する。

私は、表明された私自身の知識に基づく陳述が真実であり、かつ情報と信念に関する陳述が真実であると信じることをここに申し立てる。さらに、故意に虚偽の陳述などを行った場合は、米国法典第18編第1001条に基づき、罰金、拘禁、又はその両方により処罰され、またそのような故意による虚偽の陳述は、本出願又はそれに対して与えられるいかなる特許についても、その有効性を危うくすることを理解した上で陳述が行われたことを、ここに申し立てる。

氏名： 金廣 有彦

住所： 岡山市 岡山県 日本国

(都市名、米国の州名（該当する場合）又は国名)

郵便のあて名： 〒700-0817 日本国岡山県岡山市弓之町15-28-402

国籍： 日本国 Japan

発明者の署名： 金廣 有彦



01.03.04

日付： 01.03.04  
(国際出願の顎書に発明者の署名がない場合や、規則26の3に基づいて国際出願の出願後に申立ての補充や追加がなされた場合)

氏名： 谷本 光音

住所： 岡山市 岡山県 日本国

(都市名、米国の州名（該当する場合）又は国名)

郵便のあて名： 〒703-8217 日本国岡山県岡山市土田383-1

国籍： 日本国 Japan

発明者の署名： 谷本 光音



01.03.04

日付： 01.03.04  
(国際出願の顎書に発明者の署名がない場合や、規則26の3に基づいて国際出願の出願後に申立ての補充や追加がなされた場合)



この申立ての顎書として「第VII欄(iv)の続き」がある

## 第Ⅷ欄(i)～(v)の続き 申立て

第Ⅷ欄(i)～(v)の紙面が不足する場合 (同欄(iv)において2人以上の発明者を記載する場合を含む)、「第Ⅷ欄...((i)～(v)の番号を記載)の続き」としたうえ、当該申立てと同様に必要事項を記載する。2以上の申立てにおいて紙面不足がある場合、それぞれに別々の欄を使用する。この追記欄を使用しないときは、この用紙を顧みに含めないこと。

## 第Ⅸ欄 (iv) の続き

氏名 伊藤 亘

住所 岡山市 岡山県 日本国

郵便のあて名 〒700-0011 日本国岡山県岡山市学南町3丁目13-18

国籍 日本国 JAPAN

発明者の署名 伊藤 亘 (伊藤 亘) 日付 01.03.04

## 第VIII欄(I)~(v)の続き 申立て

第VIII欄(I)~(v)の紙面が不足する場合(同欄(I)において2人以上の発明者を記載する場合を含む)、「第VIII欄...((I)~(v)の番号を記載)の続き」としたうえ、当該申立てと同様に必要事項を記載する。2以上の申立てにおいて紙面不足がある場合、それぞれに別々の欄を使用する。この追記欄を使用しないときは、この用紙を原本に含めないこと。

氏名 中村 敏一

住所 京都市 京都府 日本国

郵便のあて名 〒606-8333 日本国京都府京都市左京区岡崎法勝寺町1-4

国籍 日本国 JAPAN

発明者署名 中村 敏一 

日付 01.03.04

氏名 松本 邦夫

住所 箕面市 大阪府 日本国

郵便のあて名 〒562-0031 日本国大阪府箕面市小野原東6丁目25-2-204

国籍 日本国 JAPAN

発明者署名 松本 邦夫 

日付 01.03.04